

EXPRESSION MUSKARINERGER ACETYLCHOLINREZEPTOREN AN AFFERENZEN DER HARNBLASE VON MÄUSEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Marcus Bonitz
aus Karl-Marx-Stadt/ Chemnitz

Gießen (2015)

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Wagenlehner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Linn

Prüfungsmitglied: Prof. Dr. Heiss

Tag der Disputation: 13.01.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Funktionen der Harnblase	1
1.1.1	Der Miktionsreflex	1
1.1.2	Der Kontinenzreflex.....	2
1.2	Histologischer Aufbau der Harnblasenwand	3
1.3	Dysfunktionen der Harnblase	4
1.4	Medikamentöse Therapie der Detrusorüberaktivität	6
1.5	Efferente Innervation der Harnblase.....	6
1.6	Afferenzen der Harnblase	7
1.6.1	Dehnungssensitive Afferenzen.....	9
1.6.2	Dehnungsinsensitive Afferenzen	11
1.6.3	Signaltransduktion und Chemosensitivität	12
1.7	Molekulare Anatomie des neuronalen cholinergen Systems.....	12
1.8	Molekulare Anatomie des urothelialen cholinergen Systems	13
1.9	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	14
1.10	Bedeutung des Urothels bei der Entstehung sensorischer Informationen.....	19
1.11	Fragestellung und Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Gewinnung von Gewebe	23
2.1.1	Tiere.....	23
2.1.2	Injektion von Substanzen	23
2.1.3	Präparation der Spinalganglien (DRG) und von Kontrollgeweben	24
2.1.4	Gewebeeinbettung	24
2.2	Laserassistierte Mikrodisektion mit nachfolgender RT-PCR Analyse.....	24
2.2.1	Gewinnung von Nervenzellkörpern.....	24
2.2.2	Reverse Transkription	25
2.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
2.2.4	Kontrollreaktionen	28
2.2.5	Gelelektrophorese.....	29
2.3	Immunhistochemische Verfahren	30
2.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz an Kryoschnitten	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Laserassistierte Mikrodisektionen.....	32
3.1.1	Bilddokumentation der Mikrodisektionen	32
3.1.2	RT-PCR der Kontrollen	33
3.1.3	RT-PCR retrograd markierter und nicht-markierter Neurone	35
3.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	37
3.2.1	Kontrollgewebe	37
3.2.2	DRG.....	37
3.3	Zellgrößen FB-positiver Neurone.....	40
4	Diskussion.....	42

4.1	Untersuchung der DRG L6 und S1	42
4.2	Aussagekraft und Grenzen der nachgewiesenen mAChR-Expression mittels Immunhistochemie.....	43
4.3	Aussagekraft und Grenzen der nachgewiesenen mAChR-Expression mittels laserassistierter Mikrodissektion und nachfolgender RT-PCR.....	43
4.4	Bedeutung des Urothels bei der Entstehung und Modulation afferenter Impulse.....	45
4.5	Bedeutung der mAChRs an primären Afferenzen der Harnblase bei der Entstehung und Modulation afferenter Impulse	48
5	Zusammenfassung.....	51
6	Summary.....	52
7	Abkürzungsverzeichnis	53
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	55
9	Literaturverzeichnis	57
10	Publikation.....	68
10.1	Originalarbeit.....	68
10.2	Abstracts	68
11	Erklärung zur Dissertation.....	69
12	Danksagung.....	70

1 Einleitung

1.1 Funktionen der Harnblase

Unter physiologischen Bedingungen erfüllt der untere Harntrakt zwei wichtige Aufgaben. Er ermöglicht die Speicherung von Harn über einen längeren Zeitraum, um diesen bei entsprechender Blasenfüllung spontan und rasch aus dem Körper zu eliminieren. Eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Harnspeicherung ist die Relaxation des glatten Musculus detrusor vesicae (Detrusormuskel) in der Füllungsphase. Die Harnentleerung erfordert einen koordinierten Ablauf der Blasenkontraktion und Relaxation der Urethra (Andersson und Arner, 2004). Die Phasen der Harnspeicherung und Entleerung bei der Miktion werden durch eine Reihe von Reflexen reguliert, die ein komplexes Muster von afferenten und efferenten Signalwegen zeigen. Dabei sind sympathische, parasympathische, somatische und sensorische Nervenfasern beteiligt (Fowler et al., 2008).

1.1.1 Der Miktionsreflex

Der Miktionsreflex unterliegt bei Feten und Neugeborenen hauptsächlich spinaler Kontrolle. Im Laufe der Reifung des ZNS entsteht durch Ausbildung zerebraler Miktionszentren und absteigender inhibitorischer Bahnen ein spinobulbospinaler Reflexbogen (Andersson und Wein, 2004). Der entscheidende Stimulus für den afferenten Schenkel des Miktionsreflexes ist die Dehnung der Harnblasenwand während der Füllungsphase (De Groat et al., 1999, zitiert nach Andersson und Wein, 2004). Mit steigender Blasenfüllung werden proportional zum intravesikalen Druck zunehmend niederschwellige dehnungssensitive Afferenzen erregt (Iggo, 1955; Shea et al., 2000). Diese myelinisierten Afferenzen (A δ -Afferenzen) werden bei einem intravesikalen Druck über 5 cm/H₂O aktiv und zeigen eine zunehmende Feuerrate mit steigendem Druck (De Groat et al., 1982). Die afferente Erregung wird über pelvine Nerven und lumbale Nn. splanchnici dem lumbosakralen Rückenmark zugeleitet (Xu und Gebhart 2008) und erreicht dort das afferente Projektionsgebiet (Lissauer Trakt). Durch exzitatorische und inhibitorische interneuronale Verknüpfungen zwischen dem Lissauer Trakt und der parasympathische Kerngruppe in Segmenthöhe S2-S4 (Morgan et al., 1981) kann bereits auf spinaler Ebene eine parasympathische Aktivierung moduliert werden (De Groat und Yoshimura, 2011). Beim gesunden Erwachsenen wird die Erregung auf aufsteigende spinoretikuläre Bahnen verschaltet und dem

periaquäduktalen Höhlengrau zugeleitet. Dieses kommuniziert mit dem pontinen Tegmentum, welches bei der Miktionskontrolle zwei funktionell verschiedene Kerngebiete enthält (Griffiths et al., 1990, zitiert nach Abrams und Andersson, 2007). In der dorsomedial gelegenen „M“-Region befindet sich das pontine Miktionszentrum, auch „Barrington’s Kern“ genannt (Blok und Holstege, 1999). Die Aktivität der pontinen und spinalen Reflexzentren wird darüber hinaus von Zellgruppen des kaudalen, präoptischen Hypothalamus und kortikalen Neuronengruppen, insbesondere des medialen frontalen Kortex beeinflusst (Vizzard et al, 1995; Griffiths und Tadic, 2008). Rostral des Pons gelegene Zentren spielen eine wichtige Rolle bei der Entscheidungsfindung, wann die Miktion stattfinden sollte. Dadurch unterliegt die Miktion beim gesunden Erwachsenen letztlich suprapontiner Kontrolle (Block et al., 1997, zitiert nach Fowler et al., 2008; Nardos et al., 2014). Zur Einleitung der Miktion kommt es, wenn die Aktivität des pontinen Miktionszentrums und die sakrale parasymphatische Aktivität durch suprapontine Zentren nicht unterdrückt werden. In diesem Falle dominiert die efferente Erregung parasymphatischer Neurone aus dem Sakralmark (Fowler et al., 2008). Nach Übertragung efferenter Impulse auf die glatte Blasenmuskulatur wird durch Vermittlung der Detrusorkontraktion die Blase entleert.

1.1.2 Der Kontinenzreflex

Vom Endorgan her betrachtet sind die Relaxation des Detrusormuskels und die Kontraktion des quergestreiften M. sphincter urethrae Voraussetzungen für eine effiziente Harnspeicherung. Vermittelt werden diese Funktionen durch den Kontinenzreflex, der als Gegenspieler des Miktionsreflexes zu betrachten ist. Neurophysiologische Voraussetzung ist eine permanente Hemmung im viszeromotorischen Schenkel des Miktionsreflexes während der Füllungsphase (Fowler et al., 2008). Hierbei haben beim gesunden Erwachsenen pontine und kortikale Miktionszentren zentrale Bedeutung. Die in der Pons weiter lateral des „Barrington’s Kern“ gelegene „L“-Region dient als dessen Gegenspieler und trägt zur Hemmung der Miktion und zur Aktivierung des quergestreiften M. sphincter urogenitale bei (Blok und Holstege, 1999). Hemmende Impulse werden über absteigende, retikulospinale Bahnen einer sympathischen thorakolumbalen- und einer sakralen parasymphatischen Kerngruppe zugeleitet. Beide Kerngruppen kommunizieren über Interneurone, wodurch die Abstimmung des Kontinenz- und Miktionsreflexes ermöglicht wird. Bei Aufrechterhaltung der Füllungsphase wird die parasymphatische Aktivierung des Detrusormuskels aus dem sakralen Kerngebiet gehemmt. Außerdem wird gleichzeitig der quergestreifte Sphinkter im Diaphragma urogenitale über den Onuf-Kern, einem

Kerngebiet im sakralen Rückenmark, über Afferenzen, die mit dem N. pudendus verlaufen, aktiviert (Onufrowicz 1899; Fowler et al., 2008).

1.2 Histologischer Aufbau der Harnblasenwand

Histologisches Merkmal der ableitenden Harnwege ist das Urothel, welches die luminale Seite auskleidet und sich vom Übergang der Nierenpapillen zu den Nierenkelchen, Nierenbecken, Ureteren und Harnblase bis zum proximalen Teil der Urethra erstreckt. Die Lamina epithelialis, auch als Urothel oder Übergangsepithel bezeichnet, weist je nach Organlokalisierung und Dehnungszustand eine unterschiedliche Dicke auf. Das Urothel ist ein mehrreihiges bis mehrschichtiges Epithel. An der luminalen Seite befinden sich die Schirm- bzw. Deckzellen, die je nach Wanddehnung eine unterschiedliche Form haben. In entspanntem Zustand haben sie eine runde bis hochprismatische Form und die apikale Seite wölbt sich konvex in das Lumen vor. Die basale Seite zeigt stielartige Ausziehungen, die in Kontakt mit der Basalmembran stehen können. Da bei einigen Schirmzellen kein Kontakt zur Basalmembran besteht, spricht man von einer partiellen Mehrreihigkeit. Die Schirmzellen überdecken mehrere darunterliegende Intermediärzellen. Diese sind polygonal geformt und erstrecken sich von der abluminalen Seite der Schirmzellen teils bis zur nächsten Intermediärzellreihe, teils bis zur Basalmembran. Die Kern-Plasma-Relation nimmt in Richtung Basalmembran zu und ist bei den isoprismatisch geformten Basalzellen am größten. Der histologische Aufbau der Harnblasenwand ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Entsprechend der Harnblasenfüllung ändert sich die Form des Epithelverbandes. Bei leerer Harnblase ist das Epithel entspannt und kann bis zu sieben Zellschichten aufweisen. Bei voller Harnblase wird die Blasenwand gedehnt und die Epithelschicht kann bis auf wenige Zelllagen abgeflacht werden. Die Lamina propria besteht aus lockerem Bindegewebe mit eingelagerten elastischen Fasern und dient als Verschiebeschicht der Tunica mucosa gegenüber der Tunica muscularis. Bei entleerter Harnblase zeigt die Tunica mucosa eine starke Faltenbildung, welche durch Wanddehnung bei voller Harnblase verstreicht (Lewis, 2000; Birder und De Groat, 2007). In den Ureteren zeigt die Tunica muscularis eine andeutete Dreischichtung, zusammengesetzt aus einer Ringmuskelschicht, benachbart von einer inneren und äußeren Längsmuskelschicht. Diese Dreischichtung setzt sich in der Harnblase verschiedener Säugetierspezies fort. Die Tunica muscularis der menschlichen Harnblase ist durch ein komplexes, in alle Richtungen verlaufendes Geflecht von glatten Muskelbündeln gekennzeichnet. Die glatte Muskulatur bildet in der Harnblase, ausgenommen am Trigonum vesicae, den Detrusormuskel. Die Tunica

serosa besteht aus einschichtigem isoprismatischem Mesothel und überzieht die Blasenwand im kranialen Abschnitt des Corpus vesicae (Andersson und Arner, 2004)

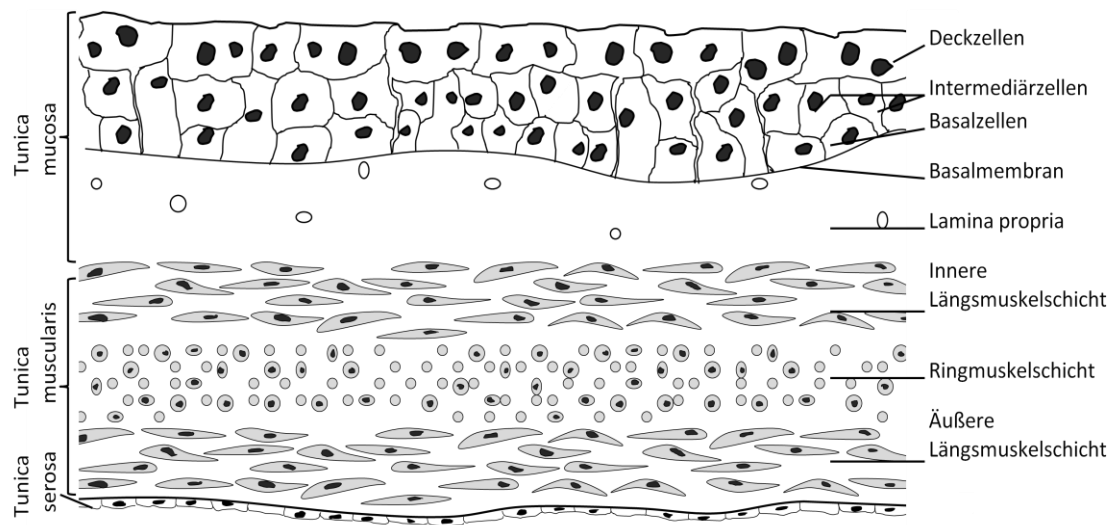


Abb. 1 Schematischer Wandaufbau des Ureters bzw. der Harnblase bei Säugetieren, von luminal nach basal: Die Tunica Mucosa setzt sich aus Deckzellen, Intermediärzellen, Basalzellen mit Basalmembran und Lamina propria zusammen. Die Deckzellen besitzen meist mehrere Kerne und überdachen aufgrund ihrer Größe mehrere Intermediärzellen. Die stielförmigen Ausziehungen der Deckzellen stellen eine Verbindung zur Basalmembran her. Weiter abluminal schließt sich die Tunica muscularis mit ihrer inneren und äußeren Längsmuskel- und der dazwischenliegenden Ringmuskelschicht an. Bei der menschlichen Harnblase ist diese Dreischichtung der Tunica muscularis nicht zu finden, da sich die Längs- und Ringmuskelschichten in einem dreidimensionalen, zirkulär verlaufenden Geflecht organisieren. Die Abgrenzung zur Bauchhöhle wird durch das flache bis isoprismatische Mesothel gekennzeichnet.

1.3 Dysfunktionen der Harnblase

Der geordnete Ablauf der Miktion ist für den Gesunden selbstverständlich. Dieses komplexe System kann jedoch durch Verletzungen, Erkrankungen des Nervensystems, Medikamente, Entzündungen, verschiedene urologische Erkrankungen oder aus ungeklärter Ursache gestört werden. Dysfunktionen der Harnblase werden in Störungen der Harnspeicherung und Störungen der Blasenleerung klassifiziert (Andersson und Wein, 2004). Im Fokus aktueller Forschung steht besonders das „Overactive Bladder Syndrome“ (OAB-Syndrom), bei dem vorwiegend die Harnspeicherung gestört ist. Dieses Syndrom wurde im Jahr 2002 von der „International Continence Society“ (ICS) einheitlich als Symptomkomplex definiert.

Dieser besteht aus imperativem Harndrang mit oder ohne Dranginkontinenz, gesteigerter Miktionsfrequenz und Nykturie. Imperativer Harndrang ist definiert als ein plötzlich auftretendes und kaum zu unterdrückendes Verlangen, die Blase zu entleeren. Bei der Dranginkontinenz kommt es zusätzlich zu unfreiwilliger und unkontrollierter Abgabe von Urin. Vor allem wenn eine Dranginkontinenz vorliegt, müssen Patienten erhebliche Einschränkungen ihrer Lebensqualität in Kauf nehmen. In vielen Fällen führt die Krankheit zu sozialer Isolation und Depression, nicht zuletzt aufgrund einer Tabuisierung dieses Themas in der Gesellschaft oder bei der ärztlichen Anamnese. Es sind weltweit mehrere Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen. Aus der multinationalen populationsbasierten Studie „The prevalence of overactive bladder“ geht hervor, dass nahezu 17% der europäischen Bevölkerung an Symptomen des OAB-Syndroms leiden, wobei 14% über eine gesteigerte Miktionsfrequenz, 9% über imperativen Harndrang und 6% über Dranginkontinenz klagen. In dieser Studie wurden Daten aus sechs europäischen Ländern (Frankreich, Deutschland, UK, Italien, Schweden und Spanien) herangezogen. Die Prävalenz steigt mit dem Alter erheblich und Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Milsom et al., 2001). In den USA wurden im Rahmen des „National Overactive Bladder Evaluation Programme“ vergleichbare Daten ermittelt (Stewart et al., 2003). Im Jahr 2006 verwendete man in der bisher größten epidemiologischen Studie die einheitliche Definition der ICS. Hier ergab sich eine Prävalenz von 11,8% statt 17% (Irwin et al., 2006). Aufgrund der hohen Aussagekraft dieser Studie entspricht dies am ehesten der tatsächlichen Prävalenz im Jahr 2006. Für die Behandlung und symptomorientiertes Management des OAB-Syndroms wurden europäische Gesundheitssysteme (Deutschland, Italien, Spanien, Schweden und Großbritannien) im Jahr 2000 mit insgesamt 4,2 Milliarden Euro belastet. Pro Patient liegen die jährlichen Kosten zwischen 269 und 706 Euro. Aufgrund steigender Prävalenz mit zunehmendem Alter und der demografischen Entwicklung in den Industrienationen wird im Jahr 2020 mit Gesamtkosten von 5,2 Milliarden Euro, also einem Anstieg von 26% gerechnet (Reeves et al., 2006). Das OAB-Syndrom ist nicht nur für den einzelnen Patienten eine immense gesundheitliche und gesellschaftliche Beeinträchtigung, sondern stellt aus epidemiologischer und volkswirtschaftlicher Sicht ein ernst zu nehmendes Gesundheitsproblem in der Bevölkerung dar.

1.4 Medikamentöse Therapie der Detrusorüberaktivität

Zur medikamentösen Beeinflussung der Detrusorkontraktion gelten muskarinrezeptor-spezifische orale Anticholinergika als sicher und wirksam. Daher werden sie in aktuellen Leitlinien als Mittel der Wahl bei der Therapie des OAB-Syndroms empfohlen (Abrams und Andersson, 2007; Andersson et al., 2009; Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V., 2010). Die Wirkung beruht auf einer kompetitiven Hemmung von Acetylcholin (ACh) an postjunctionalen muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChRs). Nach traditioneller Sichtweise bewirken Antimuskarinergika ausschließlich eine Hemmung der willkürlichen und unwillkürlichen Detrusorkontraktion, wodurch eine Steigerung der funktionellen Blasenkapazität erreicht wird. Bei der anticholinergen Therapie des OAB-Syndroms wurden traditionell nur Strukturen des efferenten Schenkels des Miktionsreflexes betrachtet. Abgesehen von gesteigerter Miktionsfrequenz ist jedoch der imperative Harndrang als bedeutendstes Leitsymptom zu sehen, da dieser als ein sehr unangenehmes Gefühl vom Patienten unvermittelt wahrgenommen wird. Es zeigte sich, dass die antimuskarinerge Therapie auch zu einer deutlichen Linderung der dysurischen Beschwerden führt (Kim et al., 2005; Finney et al., 2006). Bemerkenswert ist auch, dass Anticholinergika während der Speicherphase wirken, also zu einem Zeitpunkt, an dem es keine parasympathische Aktivität gibt und somit keine efferente Freisetzung von ACh im Detrusormuskel erfolgt (Kim et al., 2005). Dies führt einerseits zu der Annahme, dass die Detrusorüberaktivität auf einer pathologisch gesteigerten Freisetzung von ACh aus nicht-neuronalen Strukturen beruht. Andererseits könnte einer gesteigerten sensorischen Stimulation, direkt oder indirekt durch ACh induziert, ein pathologisch gesteigerter Miktionsreflex dem OAB-Syndrom zugrunde liegen. Um pathophysiologische Prozesse bei der Entstehung des OAB Syndroms zu verstehen, müssen neben der efferenten Innervation auch die Anatomie des afferenten Schenkels und Mechanismen der Signaltransduktion betrachtet werden.

1.5 Efferente Innervation der Harnblase

Die Nervenzellkörper des ersten parasympathischen Neurons liegen im Sakralmark, Segmenthöhe S2-S4. Die Axone verlassen das Rückenmark über die Vorderwurzel und werden in efferenten Nn. splanchnici pelvici parasympathischen Ganglien im kleinen Becken zugeleitet. In diesem pelvinen Plexus bilden sie Synapsen und werden in vesikalen und intramuralen Ganglia (Lincoln und Burnstock, 1993, zitiert nach Andersson und Wein, 2004) auf das zweite parasympathische Neuron verschaltet. Die ganglionäre Übertragung erfolgt durch Aktivierung nikotinischer Rezeptoren auf der

Postsynapse nach Bindung von freigesetztem ACh aus der Präsynapse. Nikotinische Rezeptoren sind liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die bei der synaptischen Übertragung im Nervensystem oder der neuromuskulären Übertragung an der motorischen Endplatte für die besonders schnelle Informationsvermittlung geeignet sind. Die synaptische Übertragung kann an dieser Stelle durch adrenerge, muskarinische, purinerge und peptiderge Rezeptoren auf der präsynaptischen Membran moduliert werden (De Groat et al., 1993, zitiert nach Andersson und Wein, 2004). Das zweite parasympathische Neuron innerviert den Detrusormuskel. Durch Freisetzung von ACh aus der Endigung werden mAChRs der glatten Muskulatur aktiviert. Die Wirkung tritt hier entsprechend langsamer ein als bei der synaptischen Übertragung zwischen Nervenzellen, ist dafür jedoch von längerer Dauer. Am Detrusormuskel des Menschen und verschiedener Säugetiere wurde die Expression aller mAChR-Subtypen nachgewiesen, wobei M2R (zur Nomenklatur der mAChRs siehe Kapitel 1.9) und M3R dominieren und M2R im Vergleich zu M3R eine dreifach stärkere Expression aufweisen (Wang et al., 1995; Hedge und Eglen, 1999). Die Kontraktion des Detrusormuskels wird bei Menschen hauptsächlich durch einen direkten Agonismus am M3R vermittelt (Chess-Williams et al., 2001). Ein Agonismus am M2R hingegen kann indirekt zu einer Detrusorkontraktion führen bzw. den M3R-vermittelten Effekt verstärken, indem die sympathische, Adenosinrezeptor- und β -Adrenorezeptor-vermittelte Detrusorrelaxation gehemmt wird (Hedge et al., 1997; Giglio et al., 2005). Die parasympathische Transmitterfreisetzung am Detrusormuskel ist durch Feedbackmechanismen reguliert. Die Freisetzung von ACh und Noradrenalin wird durch einen Agonismus an junctionalen M1R gesteigert und durch einen Agonismus an junctionalen M4R vermindert (Sellers und Chess-Williams, 2012). Für die Miktion ist somit ACh der wichtigste Neurotransmitter, da es die parasympathisch gesteuerte Konstriktion des Detrusormuskels vermittelt.

1.6 Afferenzen der Harnblase

Bei den Afferenzen der Harnblase werden zwei Typen unterschieden, die sich strukturell und funktionell voneinander unterscheiden. Die myelinisierten A δ -Afferenzen sind schnell leitend (2,2-8 m/s), C-Fasern sind langsam leitend (0,8-1,4 m/s) (Harper und Lawson, 1985). A δ -Afferenzen werden bei passiver Dehnung aktiviert, vermitteln Informationen über den Füllungszustand der Harnblase (Janig und Morrison, 1986, zitiert nach Andersson und Wein, 2004) und alle notwendigen Informationen zur Regulierung der Miktion unter physiologischen Bedingungen (Häbler et al., 1993). C-Fasern vermitteln Schmerz, ausgelöst beispielsweise durch hohen intravesikalen

Druck, chemische Noxen oder akute Inflammation (Häbler et al., 1990). Der strikt der Leitungsgeschwindigkeit folgenden Unterscheidung zwischen A δ - und C-Faser-Afferenzen steht ein vollständigeres Modell der funktionellen Eigenschaften gegenüber. Durch in vivo-Studien wurden dehnungssensitive Mechanorezeptoren und dehnungsinsensitive Chemorezeptoren differenziert. Zudem konnten ein Teil der C-Faser-Afferenzen, aber auch einige A δ -Afferenzen, weder durch starke Dehnung noch durch chemische Noxen aktiviert werden. Diese Afferenzen wurden daher als „ruhende“ Nervenfasern bezeichnet (Häbler et al., 1990; Shea et al., 2000). Mechanosensitive Nervenfasern wurden weiterhin in niederschwellige und hochschwellige Afferenzen unterteilt und kommen sowohl in C-Faser- als auch A δ -Faser-Afferenzen vor (Su et al., 1997; Sengupta und Gebhart, 1994; Shea et al., 2000). Hochschwellige Afferenzen werden bei einem intravesikalen Druck ab 20 mmHg aktiv und sind bedeutsam bei der Vermittlung von Schmerz (De Groat, 1997, zitiert nach Zagorodnyuk et al., 2006). Niederschwellige Afferenzen sind der Miktionskontrolle zugeordnet und informieren über die Wandspannung, indem proportional zum intravesikalen Druck die Erregungsrate steigt. Diese Eigenschaft wurde durch „in Serie geschaltete“ Dehnungsrezeptoren im Detrusormuskel erklärt (Iggo, 1955; Shea et al., 2000). Die meisten in vivo-Studien zeigten jedoch, dass bei weiter steigendem intravesikalen Druck die neuronale Antwort der niederschwelligen Afferenzen ein Plateau erreicht und sogar absinkt. Dieses Antwortmuster wurde einem zweiten Typ niederschwelliger Afferenzen zugeschrieben, welcher auf die Blasenfüllung, unabhängig von der Wandspannung, über hypothetische „Volumenrezeptoren“ reagiert (Morrison, 1999). Da sensible Afferenzen in enger Nachbarschaft zum Urothel, insbesondere im Bereich der Basalzellschicht und in allen darunterliegenden histologischen Schichten der Harnblase zu finden sind (Gabella und Davis, 1998; Birder et al., 2001), werden auch je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen und Mechanismen der Signaltransduktion angenommen. In einer in vivo-Studie konnten durch elektrophysiologische Messungen an einem neuartigen Blase-Nerv-Präparat nach Applikation verschiedener Stimuli auf die Harnblasenwand (Dehnung, mechanische Stimulation rezeptiver Felder mit von Frey-Haaren und chemische Stimulation) erstmals vier Klassen sensorischer Afferenzen beim Meerschweinchen unterschieden werden. Rezeptive Felder sind Regionen in der Harnblasenwand, deren Stimulation eine afferente Erregung nach sich zieht. Eine Folgestudie stützte die Daten und ergänzte unter anderem Informationen zur Chemosensitivität und Mechanotransduktion einzelner Klassen (Zagorodnyuk et al., 2006, 2007). Grundsätzlich wird weiterhin zwischen dehnungssensitiven und dehnungsinsensitiven Afferenzen unterschieden. In früheren Studien (Su et al., 1997; Sengupta und Gebhart,

1994; Shea et al., 2000) zeigten dehnungssensitive Mechanorezeptoren Leitungsgeschwindigkeiten sowohl im A δ - als auch im C-Faser-Bereich. Im Gegensatz dazu stellten Zagorodnyuk et al. (2007) in ihrer Studie über die Eigenschaften von vier Klassen sensorischer Afferenzen lediglich Leitungsgeschwindigkeiten im C-Faser-Bereich fest. In einer weiteren Studie an Mäusen wurden die mechanosensitiven Eigenschaften einzelner afferenter Nervenfasern in topographischen Bezug zu zwei Leitungsbahnen, den lumbalen Nn. splanchnici und den pelvinen Nerven, gebracht. Hierbei konnten in pelvinen Nerven „Muskel-Mechanorezeptoren“ in „hochschwelligen“ und „niederschwelligen Afferenzen“ unterschieden werden. In beiden Leitungsbahnen wurden außerdem „Serosa-Afferenzen“ identifiziert. Beide Leitungsbahnen zeigen eine verschiedene Verteilung der rezeptiven Felder in der Harnblase. Rezeptive Felder mechanosensitiver pelviner Afferenzen sind in der gesamten Harnblase gleichmäßig verteilt, rezeptive Felder der lumbalen Nn. splanchnici konzentrieren sich in Gruppen nahe des Trigonum vesicae und vereinzelt im Blasendom (Xu und Gebhart, 2008). Letztlich sind sechs Harnblasenafferenzen identifiziert worden.

1.6.1 Dehnungssensitive Afferenzen

„Serosa-Afferenzen“

Die rezeptiven Felder dieser Nervenfasern befinden sich in der Blasenwand und sind lediglich durch stumpfe Sondierung, in ihrer Reizantwort graduert je nach Reizstärke, erregbar. An lumbalen Nn. splanchnici haben sie mit 67% den größten Anteil. Bei pelvinen Afferenzen wurden 14% „Serosa-Afferenzen“ nachgewiesen (Xu und Gebhart, 2008).

„Niederschwellige Muskel-Mechanorezeptoren“

Diese Afferenzen werden bei geringer Dehnung (1 g Reizapplikation im rezeptiven Feld) erregt, wobei die Erregungsrate proportional zur Reizstärke steigt. Unter physiologischen Bedingungen dehnt sich die Harnblasenwand bei der Blasenfüllung und es kommt zu einer entsprechenden Reizantwort. Bei rascher Dehnung kommt es zum Ausbruch einer hohen Erregungsrate mit anschließender langsamer Adaptation bei anhaltender Spannung. 63% pelviner Afferenzen sind Muskel-Afferenzen, wovon der Großteil (64%) niederschwellig ist. Die Reizantwort dieser Afferenzen lag vorwiegend (n=16/25) im physiologischen Bereich, wobei die Intensität der Reizantwort der kleineren Gruppe (n= 9/25) weit über der Dimension des applizierten Reizes lag und etwa dem vierfachen der maximalen Reizantwort der pelvinen hochschwelligen Muskelafferenzen entspricht. In den lumbalen Nn. splanchnici wurden 30% der

Nervenfasern als Muskel-Afferenzen bestimmt. In dieser Leitungsbahn wurden neun von zehn Afferenzen als niederschwellig bzw. eine von zehn Afferenzen als hochschwellig klassifiziert (Xu und Gebhart, 2008). In der vorangehenden Studie von Zagorodnyuk et al. (2007) konnte keine direkte Aktivierung nach Applikation chemischer Stimulanzien (Capsaicin, hypertone Lösungen, α - β -Methyl-ATP) gefunden werden. In der Studie von Xu und Gebhart (2008) wurden jedoch in pelvinen Afferenzen chemosensitive Eigenschaften nachgewiesen, da niederschwellige Muskelafferenzen bereits während der Applikation eines inflammatorischen Mixes im leicht sauren Milieu (pH 6,0) ausgeprägte Aktivität zeigten. Sowohl bei niederschwelligen als auch bei hochschwelligen Muskel-Afferenzen kommt es nach Applikation dieses Mixes auf deren rezeptive Felder zu einer Sensibilisierung auf mechanische Stimuli, sichtbar in stärkerer Reizantwort. Bei den hochschwelligen Muskelafferenzen kommt es zum Herabsetzen der Reizschwelle.

„Hochschwellige Muskel-Mechanorezeptoren“

Diese Afferenzen werden bei stärkerer Dehnung (> 10 g Reizapplikation im rezeptiven Feld) aktiviert und haben in pelvinen Nerven mit 36% den kleineren Anteil an den „Muskel-Mechanorezeptoren“. Eine von zehn untersuchten Muskel-Afferenzen in lumbalen Nn. splanchnici wurde als hochschwellig klassifiziert. Der Anstieg der Reizantwort ist proportional zur Dehnung und entspricht dem der niederschwelligen Muskelafferenzen (Xu und Gebhard, 2008).

„Muskel-Mukosa-Mechanorezeptoren“

Mechanosensitive Afferenzen, deren terminale Nervenendigungen sich in zwei verschiedenen Gewebeschichten befinden (Lamina propria mucosae und Tunica muscularis), wurden bereits in den vagalen und pelvinen Leitungsbahnen des Darmes beschrieben (Page und Blackshaw, 1998; Brierley et al. 2004). 14% der pelvinen Afferenzen und 3% der lumbalen Nn. splanchnici werden dieser Neuronenklasse zugeordnet (Xu und Gebhard, 2008). Die Erregungsschwelle ist vergleichbar mit der von „Muskel-Mechanorezeptoren“. Diese Afferenzen können sowohl durch Dehnung als auch durch mechanische Stimulation mit von Frey-Haaren und Applikation chemischer Stimulanzien (hyperosmolare Lösungen, α - β -Methyl-ATP und Capsaicin) erregt werden. In Ruhe zeigen sie keine Spontanaktivität (Zagorodnyuk et al., 2009).

1.6.2 Dehnungsinsensitive Afferenzen

In der topographischen Studie von Xu und Gebhart (2008) wurde der Anteil dieser Neuronenklasse mit 9% bestimmt, ohne dass zwischen „stark“ oder „schwach“ antwortenden Afferenzen unterschieden wurde. In lumbalen Nn. splanchnici wurden keine rezeptiven Felder dieser Neuronenklasse gefunden. In der vorangehenden Studie von Zagorodnyuk et al. (2007) wurden 12% der Blasenafferenzen den „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ und 28% den „schwach antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ zugeordnet. Die Methodik unterscheidet sich von der Nachfolgerstudie (Xu und Gebhart, 2008), welche die rezeptiven Felder in Bezug auf beide afferenten Leitungsbahnen mit einbezieht. Daher sind die prozentualen Angaben nur in Bezug auf die abgeleiteten Nervenfasern und nicht auf alle Afferenzen der Harnblase zu beziehen. Zagorodnyuk et al. (2009) untersuchten gezielt Eigenschaften der Mechanotransduktion und Chemosensitivität durch Applikation verschiedener Transmitter, chemischer Stimulantien und mechanischer Reize.

„Stark antwortende Mukosa-Mechanorezeptoren“

Zagorodnyuk und Mitarbeiter (Zagorodnyuk et al., 2007) ordneten von den abgeleiteten Afferenzen 12% den „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ zu. Deren terminale Nervenendigungen befinden sich in der Lamina propria. Diese Afferenzen konnten nicht durch Dehnung des Gewebes (1-5 mm) aktiviert werden, zeigten aber am ungedehnten Blase-Nerv-Präparat Spontanaktivität. Nach leichtem Anstoßen der Mukosa mit von Frey-Haaren, Applikation von Hitze und chemischen Stimulanzien wurde eine starke Reizantwort gemessen. Nach mechanischer Stimulation ging die Dauer der Reizantwort über die Dauer der Reizapplikation hinaus. Nach Entfernung des Urothels zeigte sich eine signifikante Reduktion der Reizantwort durch mechanische Stimulation mit von Frey-Haaren (Zagorodnyuk et al., 2007, 2009).

„Schwach antwortende Mukosa-Mechanorezeptoren“

28% der abgeleiteten Blasenafferenzen wurden von Zagorodnyuk et al. (2007) dieser Neuronenklasse zugeordnet. Solche Afferenzen zeigten in Ruhe keine Aktivierung. Zu einer schwachen Erregung kam es lediglich nach leichtem Anstoßen der Mukosa mit von Frey-Haaren, wobei die Dauer der Reizantwort die Expositionszeit nicht überschreitet. Weder Dehnung (1-5 mm) noch chemische Stimuli führten in den meisten Fällen zu einer Aktivierung. Die mechanosensitiven Endigungen liegen ebenso wie bei den „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ und den „Muskel-

Mukosa-Mechanorezeptoren“ in der Lamina propria und somit in direkter Nachbarschaft des Urothels.

1.6.3 Signaltransduktion und Chemosensitivität

Grundsätzlich werden im afferenten System zwei Hauptmechanismen der Übertragung eines mechanischen Stimulus des Gewebes in neuronale Aktionspotenziale unterschieden. Afferenzen können entweder durch den mechanischen Stimulus direkt, oder chemisch über vorherige Mediatorfreisetzung aus umgebenden nicht-neuronalen Zellen erregt werden (Burnstock, 2001; Hamill und Martinac, 2001; Ernstrom und Chalfie, 2002). In der Studie von Zagorodnyuk et al. (2009) wurden die „Muskel-Mukosa-Mechanorezeptoren“ und die „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ hinsichtlich Chemosensitivität und Mechanotransduktion untersucht. Es zeigte sich, dass die Mechanotransduktion in beiden Neuronenklassen durch dehnungsabhängige Ionenkanäle vermittelt wird. Weder endogenes ATP, noch Mediatoren, die durch kalziumabhängige Exozytose aus Nachbarzellen freigesetzt werden, sind hierfür notwendig. Beide Neuronenklassen haben in ihrer Chemosensitivität gemeinsam, dass sie durch purinerge Agonisten (α,β -Methyl-ATP, ATP) und hypertone Lösungen erregt werden können. Der exzitatorische Effekt potenziell algogener Substanzen ist am Beispiel hypertoner Kaliumlösung bei den „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ vierfach stärker ausgeprägt. Im Gegensatz dazu können „Muskel-Mukosa-Mechanorezeptoren“ durch Serotonin erregt werden. Bemerkenswert ist, dass die Applikation von Muskarin auf deren rezeptiven Felder zu keiner Erregung führte. Hingegen wurden 24% der „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ direkt durch Muskarin erregt. Weiterhin zeigten die proinflammatorischen Mediatoren Bradykinin und Substanz P sowie Capsaicin, Lösungen mit niedrigem pH-Wert oder hoher Temperatur exzitatorische Effekte (Zagorodnyuk et al., 2009). Diese Studie zeigt einmal mehr, dass die Harnblasenwand beim Gesunden ein komplexes sensibles System zur Erfassung des Füllungszustandes und chemischer Noxen auf strukturell unterschiedlichen Ebenen aufweist.

1.7 Molekulare Anatomie des neuronalen cholinergen Systems

Der Metabolismus von ACh ist im neuronalen cholinergen System bekannt. In Nervenzellen wird ACh nach Aufnahme von Cholin und Acetyl-CoA aus Mitochondrien durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert, anschließend in Vesikel

durch den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACHT) verpackt und gespeichert. Die Freisetzung erfolgt schlagartig nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip durch Exozytose. Der Abbau geschieht im synaptischen Spalt durch die hoch effektive membranständige Acetylcholinesterase, die ACh in Cholin und Acetat spaltet. Cholin wird wiederum durch den hochaffinen Cholintransporter-1 in die Nervenzelle aufgenommen und steht der Neusynthese von ACh zur Verfügung (Kummer, 2007).

1.8 Molekulare Anatomie des urothelialen cholinergen Systems

Die Synthese und Freisetzung von ACh ist nicht nur auf Neurone beschränkt, sondern auch in einer großen Vielfalt nicht-neuronaler Zellen, insbesondere in Oberflächenepithelien zu finden (Klapproth et al., 1997; Wessler et al., 1999). Hinweise auf ein nicht-neuronales cholinerges System im Urothel verdichteten sich nach einer Studie von Yoshida et al. (2004), nachdem an menschlichen Blasenpräparaten eine geringere ACh-Freisetzung nach Entfernung der Epithelschicht im Vergleich zu intakten Präparaten gemessen wurde. Zudem wurde eine signifikante Abhängigkeit zwischen Alter und Freisetzung von ACh im Urothel gefunden, wobei die urotheliale ACh-Freisetzung mit steigendem Alter zunimmt. Dies führte zu der Annahme, das nichtneuronale ACh in physiologischen Prozessen bei der Entstehung sensibler Informationen aus der Harnblase und unter pathologischen Bedingungen zur Entstehung des imperativen Harndrangs beim OAB Syndrom involviert sein könnte (Yoshida et al., 2004, 2010). In einer Studie von Lips et al. (2007) wurden strukturelle Komponenten des urothelialen cholinergen Systems untersucht. Im Gegensatz zur neuronalen ACh-Synthese konnte im menschlichen Urothel das Syntheseeenzym Carnitin-Acetyltransferase (CarAT) anstelle der ChAT durch RT-PCR nachgewiesen werden. Die Freisetzung von ACh geschieht, im Gegensatz zu Nervenzellen, langsam und kontinuierlich über membranständige Transporter. Hierzu gehören unter anderem Polyspezifische organische Kation-Transporter (OCT). Durch immunhistochemische Färbungen, gestützt durch RT-PCR, gelang der direkte Nachweis der Isoformen OCT 1 und OCT 3, lokalisiert in der Basal- und Intermedialschicht und in apikalen Schirmzellen (Lips et al., 2007). Auch die hocheffektive Acetylcholinesterase, die den raschen Abbau von ACh im neuronalen System katalysiert, konnte in unmittelbarer Umgebung des Urothels nicht nachgewiesen werden. Durch die fehlende ultraschnelle Degradierung könnte das in geringen Mengen parakrin freigesetzte ACh im Urothel eine nachhaltige Wirkung entfalten (Kummer, 2007). Es ist also festzuhalten, dass sich das nicht-neuronale cholinerge System im Urothel auf allen Ebenen, also Synthese,

Freisetzungs-Mechanismus und Abbau von ACh, vom neuronalen cholinergen System unterscheidet.

1.9 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Es wurden fünf Gene gefunden, die Muskarinrezeptoren mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz kodieren (Bonner et al., 1987, 1988; Peralta et al., 1987). Durch das „NC-IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification“ (Vanhoutte et al., 1998, zitiert nach Caulfield und Birdsall, 1998) wurde die heutige Nomenklatur (M1R-M5R) festgelegt. Bei allen Subtypen enthält die kodierende Region kein Intron (Bonner et al., 1987, 1988) und ist zwischen verschiedenen Säugetierspezies ähnlich aufgebaut (Hall et al., 1993). Die aktuelle Erfahrung zeigt, dass Muskarinrezeptoren verschiedener Spezies sehr ähnliche pharmakologische Eigenschaften besitzen (Hannan et al., 1993). Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zur Superfamilie der guanin-nukleotid-bindenden Protein (G-Protein) gekoppelten Rezeptoren, deren Ligandenbindungsstelle sich auf der extrazellulären Seite befindet. Sie bestehen aus einer Glykoprotein- α -Helix, die zwischen intra (i)- und extrazellulären Schleifen sieben lipophile transmembranäre Domänen (TM1-TM7) enthält (Caulfield und Birdsall, 1998). Das aminoterminal Ende befindet sich extrazellulär, das carboxyterminale Ende liegt intrazellulär. Dies ist bedeutsam, da die in der Forschung eingesetzten, gegen das Carboxy-Ende gerichteten Antikörper erst nach Permeabilisierung der Zelle binden können (Lu et al., 1997). Glykosylierungen am aminoterminalen Ende spielen bei der Ligandenbindung, Stabilisierung der quarternären Rezeptorstruktur und Aktivierung des G-Proteins bei M2R keine Rolle (van Koppen und Nathanson, 1990). Zwei konservierte Cystein-Reste bilden zwischen der ersten und dritten extrazellulären Schleife eine Disulfidbrücke und stabilisieren die quarternäre Struktur (Kurtenbach et al., 1990). Ein konserviertes Aminosäuretriplet (Asp-Arg-Tyr) zwischen der transmembranären Domäne TM3 und der zweiten intrazellulären Schleife ist bedeutsam für die Expression und Funktion des M1R (Zhu et al., 1994; Lu et al., 1997). Der Nachweis von Phosphorylierungen an der i3-Schleife durch endogene Proteinkinasen zeigt, dass sich diese Schleife intrazellulär befindet (Pals-Rylaarsdam und Hosey, 1997). Bei allen Rezeptorsubtypen befindet sich am N-terminalen Ende von TM3 ein Asparaginsäure (Asp)-Rest, dem eine Interaktion mit der polaren Kopfgruppe von Aminoliganden, einschließlich ACh zugeordnet wird. Dieser Asp-Rest wird sowohl durch den Agonisten ACh-Senf als auch den Antagonisten Propylbenzilylcholin-Senf alkylisiert (Curtis et al., 1989; Spalding et al., 1994). Der natürliche Ligand für mAChRs ist ACh, ein quarternäres Ammoniumderivat, welches

mit seiner positiv geladenen Kopfgruppe und der anionischen Gruppe des Rezeptors eine hochaffine, ionische Bindung eingeht. Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor geschieht hauptsächlich, aber nicht ausschließlich durch solche ionischen Bindungen. Unpolare Muskarinrezeptor-Antagonisten binden ebenfalls an mAChRs, jedoch mit geringerer Affinität als ACh (Hou et al., 1996). Einerseits zeigen Aminosäuresequenzen von Muskarinrezeptoren und anderen Vertretern G-Protein gekoppelter Rezeptoren viele Homologien, andererseits unterscheidet sich die molekulare Struktur der Rezeptorsubtypen in ihrer Aminosäuresequenz der i3-Schleife zwischen den M1R/M3R/M5R- und M2R/M4R. Diese strukturelle Unterscheidung könnte die Ursache der spezifischen Bindungseigenschaften in beiden Gruppen sein (Humble et al., 1990; Wess, 1993, 1996; Wess et al., 1997, zitiert nach Caulfield und Birdsall, 1998). Die spezifischen Bindungseigenschaften des M3R sind in einer kurzen Aminosäuresequenz in einem Bereich zwischen der TM3 und der i2-Schleife sowie in einer membrannahen Region der i3-Schleife determiniert (Blin et al., 1995). In vergleichbaren Studien ließ sich eine 4-Aminosäuresequenz (Val-Thr-Ile-Leu) als Rezeptorbindungsstelle zwischen M2R und dem G-Protein in einem Bereich zwischen i3-Schleife und der TM6 lokalisieren (Wess et al., 1997). Auch in anderen Rezeptoren, die mit hoher Spezifität α -Untereinheiten von G-Proteinen binden, wurde diese Aminosäuresequenz nachgewiesen (Liu et al., 1995). Neben der orthosterischen Bindungsstelle für den natürlichen Liganden ACh gibt es zudem ein allosterisches Bindungsareal auf der extrazellulären Seite (Ellis et al., 1993; Voigtländer et al., 2003). Nach dem Prinzip der allosterischen Modulation beeinflusst der allosterische Ligand die orthosterischen Bindungseigenschaften. Hierbei kommt es an der orthosterischen Bindungsstelle entweder zu positiver Kooperativität, negativer Kooperativität oder zu keinem Effekt (Stockton et al., 1983; Kostenis et al., 1996; Lazareno et al., 1998; Gregory et al., 2007). Nach konventioneller Sicht lösen orthosterische Liganden nach Rezeptorbindung eine definierte Signalkaskade aus. Hingegen wird der allosterischen Modulation das Konzept einer funktionellen Selektivität und zunehmende therapeutische Relevanz zugesprochen (Gao und Jacobson, 2013). Mittels Röntgen-Kristallographie gelang es Haga et al. (2012) und Kruse et al. (2012, 2013) die dreidimensionalen Strukturen inaktiver M2R und M3R und die Konformation des aktiven M2R aufzudecken. Für die Untersuchung der inaktiven Rezeptorkonformation wurden humane M2R (Haga et al., 2012) und M3R der Ratte (Kruse et al., 2012) im Komplex mit je einem Antagonisten in eine kristalline Form gebracht. Für den M2R wurde der Antagonist 3-Quinuclidinyl Benzilat (QNB) und für den M3R der inverse Agonist Tiotropium verwendet. Im M2R-Tiotropium Komplex liegt die Bindungstasche für den Liganden im transmembranären Bereich, wobei Aminosäure-Seitenketten der

TM3, 4, 5, 6 und 7 Kontaktstellen bilden. Bemerkenswert ist, dass diese Aminosäureketten in allen 5 mAChR-Subtypen vollständig konserviert sind (Kruse et al., 2012). Auf molekularer Ebene könnte dies erklären, warum es bisher noch nicht gelang, orthosterische mAChR-Agonisten oder Antagonisten mit sehr hoher Subtypenspezifität zu entwickeln. Kruse et al (2014) charakterisierten am kristallinen M3R-Tiotropium-Komplex die Struktur der orthosterischen und erstmals auch allosterischen Rezeptorbindungsstelle(n). Die orthosterische Bindungsstelle am M3R-Tiotropium-Komplex ist unter anderem durch eine ionische Bindung zwischen dem positiv geladenen Amin Tiotropium und einer negativ geladenen Seitenkette (D147^{3.32}) an der TM3 gekennzeichnet. Drei konservierte Tyrosinreste bilden eine Art Deckel oberhalb der Rezeptorbindungsstelle. In der dreidimensionalen Darstellung zeigen Kruse et al. (2014) hierdurch eine inkomplette Abgrenzung zwischen dem transmembranären Rezeptorkern mit der orthosterischen Bindungsstelle und einem größeren, für gelöste Stoffe leicht zugänglichen extrazellulären Vorhof. Die Ausbildung einer solchen Kavität hat Einfluss auf die Kinetik der Liganden und liefert beispielsweise eine Modellvorstellung für die langsame Dissoziation des Tiotropium vom M3R. Untersuchungen des M2R-QNB-Komplexes zeigen prinzipiell gleiche Ergebnisse (Haga et al., 2012 und Kruse et al., 2012). Im Gegensatz zur orthosterischen Bindungsstelle sind die Tyrosinreste am extrazellulären Vorhof weniger stark zwischen den mAChR-Subtypen konserviert (Kruse et al. 2012). Die strukturellen Eigenschaften des Agonisten-aktivierten M2R wurden am M2R-Iperoxo-Komplex untersucht. Iperoxo ist ein Superagonist mit sehr hoher Affinität am orthosterischen M2R und derzeit für Untersuchungen der Konformation des aktiven M2R am besten geeignet (Schrage et al., 2014). Die Bindung von Iperoxo am M2R führt zu einer signifikanten Kontraktion der orthosterischen Bindungsstelle, wodurch der Ligand in einer Kavität komplett umschlossen und vom extrazellulären Raum getrennt wird. Dies wird durch eine Einwärtsbewegung der TM5, 6 und 7 in Richtung des Liganden und einer leichten axialen Drehung der TM3 verursacht. Diese Konformationsänderung wird durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Details hierzu siehe Kruse et al., 2014). Auf struktureller Ebene konnte erstmals die Interaktion eines allosterischen Modulators am M2R gezeigt werden. Der allosterische Ligand LY2119620 zeigt stark positive Kooperativität für Iperoxo und bewirkt eine bis zu 25-fache Steigerung der selektiven Affinität des Liganden für den M2R (Kruse et al., 2013). Bemerkenswert ist, dass die Bindungsstelle für LY2119620 erst durch den M2R-Iperoxo Komplex präformiert wird. Der allosterische Modulator befindet sich oberhalb der orthosterischen Kavität am extrazellulären Vorhof. In dieser Region entstehen vielseitige Interaktionen zwischen Rezeptor und allosterischen Modulator durch diverse chemische Bindungen,

wodurch letztlich die aktive Rezeptorkonformation stabilisiert und die Dissoziation des Liganden von der orthosterischen Bindungsstelle verzögert wird (Kruse et al., 2014).

Auf Ebene der Signaltransduktion lassen sich die mAChRs in zwei Gruppen unterscheiden. Die ungerade nummerierten mAChRs (M1R/M3R/M5R) binden typischerweise α -Untereinheiten der $G_{q/11}$ -Familie, hingegen binden die gerade nummerierten mAChRs (M2R/M4R) α -Untereinheiten der G_i und G_o Proteine (Caulfield, 1993; Felder, 1995). Beide G-Protein-Familien aktivieren verschiedene Second-messenger und somit verschiedene Funktionen: G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie vermitteln eine Aktivierung der Phospholipase C, welche aus dem Membranmolekül Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) das hydrophile Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) abspaltet. Durch Besetzung der IP_3 -Bindungsstelle an Kalziumkanälen des glatten endoplasmatischen Retikulums wird deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und intrazellulär gespeichertes Kalzium in das Zytosol abgegeben. Die rasche Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration kann je nach Zellart verschiedene Effekte vermitteln. In Nervenzellen trägt diese Kaskade zur Entstehung eines Aktionspotenzials bei (Felder, 1995; Armstrong und Hille, 1998). In einer Studie von Tata et al. (2000) wurde an sensorischen Nervenzellen von Hühnern die Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration und die Produktion von IP_3 nach Stimulierung von mAChRs durch Oxotremorin-Methiodid (OxoM), einem nichtselektiven mAChR-Agonist, untersucht. Einerseits führt eine selektive Blockade der Kalzium-ATPase am glatten endoplasmatischen Retikulum (durch Thapsigargin) zu einer kompletten Unterdrückung der intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung, andererseits hat die Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium keinen Einfluss auf den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Das glatte endoplasmatische Retikulum kann daher als Quelle der durch die $G_{q/11}$ -Familie vermittelten zytosolischen Kalziumfreisetzung definiert werden. Die durch die $G_{i/o}$ -Familie vermittelten inhibitorischen Effekte, ausgelöst durch den Agonismus am M2R und M4R, sind Gegenstand intensiver Forschung. G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie vermitteln durch Hemmung der membranständigen Adenylatzyklase letztlich eine Hemmung des Kalziumeinstroms in die Zelle. Die Adenylatzyklase ist ein Schlüsselenzym für die Phosphorylierung intrazellulärer Effektorproteine. Eine aktivierte Adenylatzyklase führt über Bildung von cAMP zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, welche wiederum durch Phosphorylierung verschiedener Effektorproteine, beispielsweise membranständiger Kalziumkanäle, zu deren Aktivierung bzw. Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit führt (Felder, 1995). Eine Hemmung spannungsabhängiger Kalziumkanäle kann auch direkt durch Bindung dissoziierter β/γ -Untereinheiten der

heterotrimeren $G_{i/o}$ -Proteine nach Agonismus am M2R erfolgen (Krejci et al., 2004). In einer Studie von Duttaroy et al. (2002) wurde der analgetische Effekt von OxoM an M2R und M4R einzel- und doppel-gendefizienten Mäusen untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Bei M2R- und M2R/M4R-gendefizienten Mäusen zeigte sich kein analgetischer Effekt durch OxoM. Im Gegensatz dazu wurde an M4R-gendefizienten Mäusen noch der volle analgetische Effekt gemessen. Durch den Einsatz von Agonisten (CMI-936 und CMI-1145) mit einer sechsfach höheren Affinität für den M4R konnte sowohl in M2R- als auch in M2R/M4R-gendefizienten Mäusen eine Reduktion des analgetischen Effektes gemessen werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass die muskarinerge Analgesie durch einen Agonismus am M2R und M4R vermittelt wird. Chen und Pan (2003) stellten bei Ratten mit neuropathischem Schmerzsyndrom bei induzierter diabetischer Neuropathie einen deutlich größeren analgetischen Effekt nach intrathekalen Injektion eines Acetylcholinesterasehemmers (Neostigmin) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe fest, was eine gesteigerte Expression des M2R vermuten ließ. Hayashida et al. (2006) konnten nach Verletzung des Axons von primären Afferenzen eine gesteigerte Expression des inhibitorischen M2R sowohl in verletzten als auch in benachbarten, unverletzten Neuronen nachweisen.

An primären Afferenzen sind die T-Typ spannungsaktivierten Kalziumkanäle (VACCs) und die hoch-spannungsaktivierten Kalziumkanäle (HVACCs) von Bedeutung. VACCs können durch schwache Depolarisation bei niedriger Erregungsschwelle aktiviert werden, wodurch eine starke Feuerrate über Aktivierung der HVACCs getriggert und somit die neuronale Erregbarkeit gesteigert werden kann. VACCs haben daher eine Schlüsselfunktion in neuronaler Membranerregbarkeit (Carbone und Lux, 1984; Perez-Reyes, 2003). In einer Studie von Cao et al. (2011) wurden durch elektrophysiologische Messungen Effekte auf den Kalzium-Einstrom über membranständige HVACCs nach unselektivem Agonismus von mAChRs an primären Afferenzen von Ratten untersucht. Nach Applikation von OxoM auf Neuronen wurde eine signifikante Hemmung der nach intrazellulär gerichteten HVACC-Ströme an entsprechenden Nervenzellen gemessen. Um eine genauere Aussage über den Einfluss von mAChRs zu treffen, wurden Himbacin, ein M2R- und M4R-selektiver Antagonist (Miller et al., 1992) und MT-3, ein hochselektiver M4R-Antagonist (Jolkkonen et al., 1994) eingesetzt. Nach Applikation von Himbacin wurde eine komplette Blockade des zuvor festgestellten OxoM-Effektes gemessen. Diese Beobachtung zeigt, dass M2R und M4R in Neuronen eine Hemmung der HVACC-Einwärtsströme vermitteln. Da MT-3 als hochselektiver M4R-Antagonist zur Verfügung stand, konnten durch weitere Untersuchungen inhibitorische Effekte des M2R und M4R

quantifiziert werden. Ein wesentliches Ziel der Studie von Cao et al. (2011) war, die hemmenden Effekte des M2R und M4R der Kontrollgruppe (gesunde Ratten) und Ratten mit induzierter diabetischer Neuropathie zu vergleichen. Hier scheint der M4R eine besondere Rolle einzunehmen, da die M4R-vermittelte Hemmung der HVACC-Einwärtsströme in der Verum-Gruppe bei kleinen und mittelgroßen Neuronen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesteigert war. Zudem zeigte sich eine gesteigerte M4R-Expression in Ratten mit diabetischer Neuropathie. Letztlich ließ sich in der Verum-Gruppe eine gesteigerte T-Typ VACC-Aktivität an Populationen von primären Afferenzen finden, was zu einem gesteigerten nozizeptiven Input und Hypersensitivität bei der diabetischen Neuropathie beitragen könnte. Im Gegensatz dazu zeigen im Urothel und Suburothel exprimierte mAChRs unter physiologischen Bedingungen keine tonische Aktivität. Diskutiert werden daher strukturelle Veränderungen unter pathologischen Bedingungen. Eine veränderte mAChR-Expression am Urothel und an suburothelialen Strukturen könnte direkt oder indirekt auf die Erregbarkeit sensorischer Afferenzen Einfluss nehmen (Bschleipfer et al., 2007; Kullmann et al., 2008a; Kim et al., 2008).

1.10 Bedeutung des Urothels bei der Entstehung sensorischer Informationen

Klassischerweise wurde das Urothel nur hinsichtlich seiner Barrierefunktion betrachtet. Neuere Ergebnisse zeigen, dass dieser Zellverband auf chemische und physiologische Stimuli reagieren und eine Reihe von Signalmolekülen freisetzen kann. Dies erlaubt eine Kommunikation mit benachbarten Urothelzellen und Nervenzellen. Geht man von einer epithelioneuronalen Kommunikation aus, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Dazu gehört zum Einen eine enge räumliche Verknüpfung der kommunizierenden Strukturen. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurde die Verteilung der „transient receptor potential vanilloid 1“ (TRPV1) exprimierenden afferenten Nervenfasern in der Blasenwand untersucht. Dieser Ionenkanal wird durch Vanilloide, wie z.B. Capsaicin, aktiviert und wird insbesondere von Schmerzfasern exprimiert. Es zeigte sich eine enge Nachbarschaft dieser Nervenfasern mit den Basalzellen des Urothels (Birder et al., 2001). Das Urothel zeigt zum Anderen auch sensorische Eigenschaften, da es ähnlich wie bei sensorischen Nervenfasern Mechanozeptoren (Wang et al., 2003) und verschiedene Nozizeptoren der TRP (Transient Receptor Potential channels)-Superfamilie (Birder et al., 2001, 2002a; Gevaert et al., 2007), die Purinrezeptoren P2X und P2Y (Birder et al., 2004), nikotinische Acetylcholinrezeptoren (Beckel et al., 2006) und mAChRs (Chess-

Williams, 2002), Rezeptoren für Bradykinin (Chopra et al., 2005), Norepinephrin (Birder et al., 2002b) und Nerve Growth Factor (Murray et al., 2004), exprimiert. Im menschlichen Urothel und im Urothel verschiedener Wirbeltiere wurde die Expression der mAChR Subtypen M1R-M5R nachgewiesen (Bschleipfer et al., 2007; Zarghooni et al., 2007, Kullmann et al., 2008b). Weiterhin zeigte man, dass das Urothel auf verschiedene Stimuli (Druck oder Dehnung während der Füllungsphase) reagiert, indem es Botenstoffe wie ACh, ATP, NO, Prostaglandine und Substanz P freisetzt (Birder, 2005). Wie in Kapitel 1.8 dargelegt, zeigten Lips et al. (2007) im Urothel eigenständige, vom neuronalen System verschiedene Strukturen bei der Synthese und Freisetzung von ACh. Da im Urothel nach Exposition von verschiedenen Stimuli Neurotransmitter und Mediatoren synthetisiert und freigesetzt, entsprechende Rezeptoren exprimiert werden und eine räumliche Nähe zu sensiblen Nervenfasern im Suburothel besteht, könnte hier eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion bei der Erregung sensorischer Afferenzen erfüllt werden. Diese These bestätigte eine Studie von Kullmann et al. (2008a), in welcher demonstriert wurde, dass ACh als Transmitter eine Schlüsselrolle bei der epithelioneuronalen Kommunikation einnimmt. Durch Aktivierung von mAChRs an urothelialen oder suburothelialen Strukturen konnte die Erregbarkeit von C-Faser-Afferenzen moduliert werden. In einem Zwischenschritt interagieren aus dem Urothel freigesetzte Mediatoren (NO und ATP) mit den Afferenzen direkt oder indirekt über interstitielle Zellen. In vivo zeigten sich sowohl erregende als auch hemmende Effekte auf die Detrusoraktivität (Kullmann et al., 2008a).

Es gibt noch viele offene Fragen, die die Rolle des nicht-neuronalen cholinergen Systems der Harnblase betreffen, vor allem in Hinsicht auf dessen physiologische und pathophysiologische Bedeutung. Die mit dem Alter zunehmende Freisetzung von ACh aus nicht-neuronalen Zellen des Urothels könnte im Zusammenhang mit der steigenden Prävalenz des OAB-Syndroms im Alter stehen. Es ist vorstellbar, dass der Benefit antimuskarinerges Medikamente in Bezug auf Linderung des Harndrangs während der Speicherphase durch Interaktion dieser Pharmaka mit dem nicht-neuronalen cholinergen System und seiner Wirkung auf cholinerge Rezeptoren auf afferenten Nervenfasern zustande kommt. In Anbetracht der Existenz eines nicht-neuronalen cholinergen Systems im Urothel entsteht eine neue Modellvorstellung im Pathomechanismus des OAB-Syndroms. Sofern die direkte oder indirekte Erregung afferenter Nerven durch ACh aus Urothelzellen in die physiologische Blasenfunktion involviert ist, könnte eine pathologisch gesteigerte Freisetzung von ACh oder eine Sensibilisierung der Afferenzen durch Mediatoren wie ATP, NO und Prostaglandine ein

gesteigertes Dranggefühl auslösen und somit weitere Mechanismen zur Entstehung des OAB-Syndroms in Gang setzen. Die klassische Vorstellung zur Wirksamkeit antimuskarinerges Medikamente muss durch neuere Erkenntnisse, die die Synthese und Freisetzung von Signalmolekülen aus dem Urothel einbeziehen, ergänzt werden. Für die Signaltransduktion mittels ACh zwischen Urothel und sensorischen Nerven ist das Vorhandensein cholinerges Rezeptoren an den Afferenzen entscheidend (Yoshida et al., 2004; Abrams et al., 2006; Birder und De Groat, 2007; Kullmann et al., 2008a; Matsumoto et al., 2010).

1.11 Fragestellung und Zielsetzung

Diese Arbeit soll die Expression von mAChRs in Afferenzen der Harnblase klären, insbesondere ob die funktionellen Typen M1R, M2R und M3R nachweisbar sind. Die Experimente wurden in zwei Versuchsreihen durchgeführt, in denen einerseits immunhistochemische Markierungen, andererseits laserassistierte Mikrodisektionen in Kombination mit RNA-Isolierung, Reverser Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zum Einsatz kamen. Zuvor wurde bei Mäusen ein retrogrades Neurotracing an der Harnblase durchgeführt. Dies ermöglichte an Schnitten der Spinalganglien L6 und S1 unter dem Fluoreszenz-Mikroskop eine Identifizierung jener Nervenzellkörper, die zur Harnblase projizieren. In der immunhistochemischen Versuchsreihe wurde zuerst eine Fotodokumentation dieser Gewebeschnitte angefertigt, in denen einige Nervenzellkörper den Neurotracer aufgenommen hatten. Die zweite Fotodokumentation folgte nach der Immunmarkierung. Für dieses Verfahren stand der subtypenspezifische M2R-Antikörper zur Verfügung. Nach exakter texturbezogener Überlagerung beider Bilderserien folgte die Auszählung und Messung des Zelldurchmessers retrograd markierter Nervenzellkörper mit angeschnittenem Kern. Hierbei konnten Erkenntnisse über die M2R-Expression an primären Harnblasenafferenzen gewonnen werden. Die Bestimmung der Zellgrößen zielte auf eine Unterscheidung von C-Faser- und A δ -Faser-Afferenzen ab. Hierbei konnte eine Aussage bezüglich der M2R-Expression beider Faserqualitäten getroffen werden. In der zweiten Versuchsreihe wurden lasergesteuerte Mikrodisektionen an Gewebeschnitten von Spinalganglien durchgeführt. Dabei wurden nur Anschnitte von retrograd markierten Nervenzellkörpern in ein Reaktionsgefäß aufgenommen. Das isolierte Genmaterial wurde auf M1R- und M3R-mRNA untersucht. Dieses Nachweisverfahren erlaubte eine valide Aussage über die M1R- und M3R-Expression in Afferenzen der Harnblase.

Die Klärung, ob afferente Neurone cholinergischer Kontrolle unterliegen, hat große Bedeutung für das Verständnis der Vermittlung sensorischer Informationen aus der Harnblase und der Entstehung des Dranggefühls, welches beim OAB-Syndrom pathologisch gesteigert ist. In der medikamentösen Therapie könnten sich neue Möglichkeiten in der Optimierung des Wirkungs-Risiko-Profiles bieten. Neben der Inhibierung der ACh-Freisetzung aus dem Urothel könnte durch selektive Blockade oder Stimulation bestimmter mAChR-Subtypen an sensorischen Nervenfasern ein Schritt von der bisher symptomorientierten Therapie zur kausalen Therapie ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung von Gewebe

2.1.1 Tiere

Für die Experimente wurden männliche und weibliche C57BL/6N Mäuse im Alter von 7-12 Wochen und mit einem Körpergewicht von 19-30 g verwendet. Die Tiere wurden im Zentralen Tierstall der Justus Liebig Universität Gießen unter Standardbedingungen gezüchtet. Die aktuellen Vorschriften in der BRD für die Zucht von Labortieren und Versuche mit Labortieren wurden eingehalten. Die Tierversuche und die damit verbundenen Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen (Tierversuchsantrag GI 20/10 Nr. 66/2007) genehmigt.

2.1.2 Injektion von Substanzen

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 100 µl/25 g Körpergewicht eines Narkosecocktails narkotisiert. In 1 ml Narkosemittel sind 0,2 ml Rompun® (Xylazin), 0,5 ml Ketanest® (Ketamin) und 0,3 ml Atropin in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung enthalten.

Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde ein Schmerzreiz gesetzt und auf motorische Reaktionen geachtet. Die vollständige Narkose wurde im Mittel 10 min nach der Injektion erreicht. Die Vorbereitung der Operation bestand in der Rasur des Fells im Operationsgebiet und der Fixierung der Extremitäten am Operationstisch mit Klebeband. Durch Auftragen von Bepanthen®-Salbe auf die Augen wurde das Austrocknen der Augen verhindert.

Zunächst wurde die Bauchhöhle mit einem Sagittalschnitt eröffnet und die Harnblase vorsichtig freigelegt. Anschließend wurde jeweils 1 µl des Farbstoffes Dil (1,1',Di-Octadecyl-3,3,3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat) oder Fast Blue (FB; 1% w/v; Polvlov, Groß Umstadt, Deutschland) an 3 verschiedenen Stellen der Harnblase mit Hilfe einer 5 µl Mikroliter-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in die Blasenwand injiziert. Nach diesem Eingriff wurden Bauchdecke und Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose (2-3 Stunden) wurde das Auskühlen der Tiere mit einer Rotlichtlampe verhindert.

Vier Tage nach der Farbstoffapplikation wurden die Mäuse getötet (Kapitel 2.1.3). Für den immunhistochemischen Nachweis des M2R wurde der FB-Tracer appliziert (n=7), für RT-PCR Analysen des M1R und M3R wurde der Dil-Tracer (n=8) verwendet.

2.1.3 Präparation der Spinalganglien (DRG) und von Kontrollgeweben

Die Mäuse wurden durch Inhalation von Isofluran (Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet und durch Inzision der Bauchaorta ausgeblutet. Anschließend wurde das Rückenmark frei präpariert und lumbale und sakrale DRG (L6, S1, S2, S3) unter Zuhilfenahme einer Stereolupe entnommen. Um das Ausmaß der Tracerapplikation zu beurteilen und um Referenzwerte für die Immunhistochemie und RT-PCR Analysen zu erhalten, wurden weitere Organe entnommen: Thorakolumbales Rückenmark, Harnblase, Ganglion cervicale superius (GCS) und Trachea.

2.1.4 Gewebeeinbettung

Das entnommene Gewebe wurde auf einem Tropfen Tissue Tec (Sakura O.C.T. Compound, Zoeterwoude, Niederlande) auf Filterpapier platziert und in schmelzendem 2-Methyl-Butan (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) schockgefroren. Nach 5 min Abkühlung wurde das eingebettete Gewebe in flüssigem Stickstoff gelagert. An diesem Gewebe wurden Mikrodissektionen am selben Tag durchgeführt (Kapitel 2.2.1), Gewebe für immunhistochemische Untersuchungen wurden bis zu mehreren Wochen bei -80 °C gelagert.

2.2 Laserassistierte Mikrodissektion mit nachfolgender RT-PCR Analyse

2.2.1 Gewinnung von Nervenzellkörpern

Zur Isolierung einzelner Nervenzellkörper aus unfixierten, sakralen DRG der vorbehandelten Mäuse (siehe Kapitel 2.1.2) (n=8) wurden Mikrodissektionen aus Gefrierschnitten angewandt. Die gewonnenen Zellen wurden für mRNA-Analysen eingesetzt.

Nach 30 min UV-Licht Bestrahlung (254 nm) der P.A.L.M. Membranobjektträger (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland) wurden Seriengefrierschnitte von 6 µm Dicke angefertigt (Kryostat CM 1900, Leica, Bensheim,

Deutschland) und auf die vorbehandelten Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun 30 s gefärbt, mit aqua dest. und zuletzt mit 70%igem Ethanol gespült. Aufgrund negativer Resultate in der RT-CR wurde letztlich bei der Vorbereitung der Mikrodisektionen auf die Färbung mit Hämalaun, Spülung mit Aqua dest. und Ethanol verzichtet. Die begünstigte RNA-Degradierung durch die Färbung mit Hämalaun (Wang et al., 2006) und das Herauslösen des Neurotracers aus den Kryoschnitten machten diese Anpassung des Protokolls erforderlich. Es wurde daher direkt mit den Laser-assistierten Mikrodisektionen (MicroBeam System, P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland) begonnen. Die Schnittführung des Lasers wurde so gewählt, dass nur die gewünschten Somata der Nervenzellen ohne umgebende Satellitenzellen ausgeschnitten wurden. Mithilfe der „Laser-Pressure-Catapulting“ (LPC) Technologie wurden diese in den Deckel eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes katapultiert (MicroBeam System, P.A.L.M. Microlaser Technologies). Zur besseren Haftung der Zellen wurde die Innenseite des Deckels vorher mit 2,5 µl Mineralöl benetzt. Nach dem Beladen des Deckels mit Zellen wurde bei jeder Probe kontrolliert, ob Zellen im Deckel haften geblieben sind. Dafür wurde der Deckel mit dem 5x Objektiv fokussiert und die Zahl der Zellen abgeschätzt. Für die Positivkontrolle des M1R und M3R waren Vorversuche an unbehandelten Mäusen erforderlich (Kapitel 2.2.4). Bei Verwendung der Ganglien von vorbehandelten Mäusen (Kapitel 2.1.2) wurden mit dem Tracer retrograd markierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop unter UV-Anregung identifiziert. Hierbei wurden n=10-50 Zellen gesammelt. Die Gewebeschnitte wurden mit der im Mikroskop integrierten Kamera fotografiert und die Durchführung der Mikrodisektionen mit Bildern dokumentiert (Abb. 1-4). Nach Anfertigung der Schnitte wurden die Zellen innerhalb von 2 Stunden aufgefangen. Anschließend wurden zu jeder Probe 346,5 µl RLT Lysisbuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) zugegeben und die Zellen nach kurzem Zentrifugieren von dem Deckel in die Pufferlösung überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum nächsten Tag bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Reverse Transkription

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Micro Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Ein DNase-Verdau war notwendig, da die Gene der mAChRs keine Introns im kodierenden Bereich besitzen und daher nicht-intronspannende Primer benutzt wurden. Die von der mRNA transkribierte und mittels PCR amplifizierte DNA wäre ohne den Verdau nicht von der genomischen DNA in der Gelelektrophorese unterscheidbar.

Die RNA wurde von der Säule mit 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert und 5 min auf Eis gelegt. Anschließend wurde die RNA im Thermocycler 10 min bei 70°C inkubiert und für 5 min auf Eis gelegt. Nachdem jede RNA-Probe in 2 PCR-Gefäße mit jeweils 10 µl aufgeteilt wurde, konnte ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt werden (Tabelle 1).

Reagenz	Menge Positivkontrolle	Menge Negativkontrolle
10xPCR Buffer II (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8.3)	2 µl	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl
Random Hexamers (50 mM)	1 µl	1 µl
RNAse Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	0,5 µl	1,5 µl
MuLV reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl	-

Tabelle 1. Auflistung der verwendeten Reagenzien und Mengen bei der Durchführung einer reversen Transkription. Alle Reagenzien wurden von Applied Biosystems bezogen.

Nach 10 min Inkubation bei 20°C wurde die RNA 75 min bei 43°C umgeschrieben. Zur Denaturierung der MuLV RT wurde der Ansatz 5 min auf 99°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die nun cDNA enthaltenden Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurden 4 µl cDNA (siehe Kapitel 2.2.2) und jeweils ein nicht-intronspannendes Forward und Reverse Primerpaar (Tabelle 2; Synthese MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) zu folgendem Mastermix angesetzt und in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben (Tabelle 3).

Gen	Genbank Accession №	Primerpaare	Produkt- größe (bp)	Position der amplifi- zierten DNA Fragmente
M1R	NM_007698	Forward: cag tcc caa cat cac cgt ctt Reward: gag aac gaa gga aac caa cca c	441	208-648
M3R	AF264050	Forward: gta caa cct cgc ctt tgt ttc c Reward: gac aag gat gtt gcc gat gat g	244	32-275
β-2- Mikro- globulin (BMG)	NM_009735	Forward: acc ctg gtc ttt ctg gtg ct Reverse: aat gtg agg cgg gtg gaa	150	67-216

Tabelle 2. Auflistung der verwendeten Primerpaare unter Angabe der Accession №, DNA-Sequenz, Produktgröße und Position der amplifizierten DNA-Fragmente im jeweiligen Gen.

Reagenz	Menge
10xPCR Buffer II (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8,3)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer (Fwd/Rev, 20 pM)	0,5 µl
H ₂ O	15,3 µl
AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Tabelle 3. Auflistung der Reagenzien und Mengen bei der Durchführung einer PCR. Alle Reagenzien wurden von Applied Biosystems, Darmstadt, bezogen.

Zur Amplifizierung wurde ein Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf) verwendet. Um die Wasserstoff-Brückenbindungen doppelsträngiger DNA zu lösen, wurde der PCR Ansatz zuerst 10 min auf 95°C erhitzt. Durch diesen Schritt wurde die Polymerase schrittweise aktiviert und damit eine Effizienzsteigerung für nachfolgende Zyklen erreicht. Es folgten 50 Zyklen nach folgendem Ablauf: Erhitzen für 30 s auf 95°C zum Schmelzen doppelsträngiger DNA, 20 s Anlagerungstemperatur von 62°C (spezifisch für jedes verwendete Primerpaar), 30 s Synthese neuer DNA-Fragmente bei 73°C. Nach Beendigung der Zyklen wurde der Ansatz 7 min auf 73°C erhitzt um noch unvollständige Synthesen abzuschließen. Die PCR-Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.4 Kontrollreaktionen

Durch Anwendung laserassistierter Mikrodissektionen wurde mit sehr geringen Probenmengen gearbeitet. Dies machte erforderlich, die Menge der Zellen zu ermitteln, bei denen ein positives Ergebnis verschiedener Targets gezeigt werden kann. Für die Positivkontrolle des M1R wurde das GCS gewählt (Hamilton et al. 1997) und in aufsteigenden Zehnerschritten 10-50 Nervenzellanschnitte von Kryoschnitten dieses Ganglions gesammelt. Für die Positivkontrolle des M3R wurden verschiedene Mengen an Trachealepithel gesammelt (Klein et al., 2009). Die Schnittführung des Lasers wurde so gewählt, dass durch Zerstörung der basal gelegenen Zellkerne bereits bei der Probenaufnahme ein Großteil der genomischen DNA beseitigt wurde. Um eine Kontamination des Mineralöls, der Reaktionsgefäße oder der in Kapitel 2.2.1 verwendeten Reagenzien auszuschließen, wurde für alle Versuche eine Leerprobe angefertigt. Dafür wurde ein Reaktionsgefäß mit allen nach der Mikrodissektion verwendeten Reagenzien, jedoch nicht mit Zellen beladen. Da nicht-intronspannende Primer verwendet wurden, war vor der cDNA-Synthese ein DNase Verdau notwendig (Kapitel 2.2.2). Durch anschließende Teilung der RNA-Proben wurden ein positiver Ansatz (mit RT) und ein Kontroll-Ansatz (ohne RT) angefertigt. Dies diente zur Effektivitätskontrolle des DNase-Verdaus und dem Ausschluss der Amplifizierung genomischer DNA.

Die Positivkontrollen der PCR (Kapitel 2.2.3) dienten zur Kontrolle der Effizienz der RNA Isolierung und der Transkription. Hierfür wurde der BMG Primer verwendet. Um eine Verunreinigung der hierbei verwendeten Reagenzien mit genomischer DNA auszuschließen, wurde bei den PCR-Reaktionen jeweils eine Kontrolle mit Wasser anstelle von cDNA angesetzt.

2.2.5 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Produktgröße amplifizierter DNA-Fragmente wurde eine Elektrophorese mit einem 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarose Gel verwendet (Tabelle 4).

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Agarose	20 g/l	Genegarose L.E.; iNNO-TRAIN Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland
TRIS	482 g/l	USB, Cleveland, USA
Eisessig	104,2 ml/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	200 ml/l 0,5 M	Invitrogen
Ethidiumbromid, 1%	10 µl/l	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4. Auflistung der Bestandteile, deren Hersteller und Konzentrationen eines 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarose Gels. Die Mengenangaben für TRIS, Eisessig und EDTA beziehen sich auf 1 l H₂O.

Der DNA wurde ein Ladepuffer als Trägersubstanz hinzugegeben (Tabelle 5).

Reagenz	Menge	Hersteller
Orange G dye	0,1 g	Sigma
Glycerol, 87%	5,88 ml	
EDTA	1 ml	
TRIS-HCL-Puffer	250 µl	

Tabelle 5. Auflistung der Bestandteile, Hersteller und Mengen des verwendeten Ladepuffers. Die Mengenangaben der Ladepufferbestandteile beziehen sich auf 10 ml H₂O.

Fünf µl des Ladepuffers wurden mit 25 µl der PCR-Produkte gemischt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl in das Gel aufgetragen. Die horizontale Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit einer Spannung von 150 V über 45 min in einer Horizon 11x14 Kammer (Live Technologies, Gibco). Als Marker wurde 10 µl 100 bp DNA Ladder

(Invitrogen) eingesetzt. Unter UV-Licht Anregung wurden die PCR-Fragmente im Gel detektiert.

2.3 Immunhistochemische Verfahren

2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz an Kryoschnitten

Die spezifische Färbung von mAChR positiven afferenten Neuronen der Harnblase war nur für den M2R möglich. Bei Anwendung einer Acetonfixierung wurde der hydrophile Tracer FB während der bei der Färbung erforderlichen Waschvorgänge aus den Zellen gelöst. Das Auswaschen des Tracers wäre mit einer Aldehyd-Fixierung des Gewebes verhindert worden, jedoch machte jeglicher Einsatz von Aldehyden eine erfolgreiche Immunfärbung unmöglich. Diese Besonderheit erforderte ein Protokoll, welches vor Durchführung der Immunfärbung eine Fotodokumentation der FB-positiven Neurone der Kryoschnitte vorsieht.

Von dem zu untersuchenden Gewebe wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 µm (Kryostat CM 1900, Leica, Bensheim, Deutschland) angefertigt und auf SuperFrost Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) gezogen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) unter dem 20x Objektiv fotografiert. Um die Fluoreszenzfarbstoffe Aminomethylcoumarin-Acetat (AMCA), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Indocarbocyanin (Cy3) zu erfassen, wurden entsprechende Erregerfilter und Sperrfilter verwendet. Tabelle 6 zeigt die Zuordnung der Filter zum jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff. Unter UV-Anregung des AMCA Fluoreszenzfarbstoffes wurden zunächst FB positive Zellen und anschließend benachbarte Gewebestrukturen sichtbar gemacht. Aufgrund der Autofluoreszenz verschiedener Gewebeanteile wurde die Lokalisation der FB positiven Zellen im Gewebekontext ermöglicht. Hierzu dienten Aufnahmen des Gewebes nach Anregung im FITC-Filterset.

Fluoreszenz-farbstoff	Filtername	Farbe	Erregerfilter [nm]	Sperrfilter [nm]
AMCA	U-MNUA	Blassblau	360-370	420-460
FITC	U-MNIBA	Grün	460-490	515-550
Cy3	U-M41007ACy3	Rot-orange	525-560	570-650

Tabelle 6. Zuordnung der Erreger- und Sperrfilter zum jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff unter Angabe des Filternamens, Farbe und Wellenlängen in Nanometer.

Nach der ersten Fluoreszenzmikroskopie wurden die Schnitte mit Aceton kalt (-20°C, Merck, Darmstadt) über 10 Minuten fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Es folgte die Inkubation mit einem monoklonalen M2R-Antikörper in PBS+S über Nacht. Dieser Antikörper stammt aus der Ratte (1:800; Klon: mAB367; Chemikon, Temecula, CA, USA). Seine Spezifität wurde zuvor an M2R-gendefizienten Mäusen überprüft (Nandigama et al., 2010). Das Gewebe wurde 2x über 10 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper Esel-Anti-Ratte IgG (1:1000; Katalognummer 68682; Dianova, Hamburg, BRD) in PBS+S über eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen (s.o.) folgte die Fixierung der Antikörper auf dem Gewebeschnitt mit Paraformaldehyd (4% in PBS) (Sigma-Aldrich, Seelze, BRD) über 10 min. Nach dem letzten Waschvorgang (s.o.) wurden die Schnitte mit gepuffertem Glycerol, pH 8,6, unter Deckgläsern (Fa Langenbrinck, Ennendingen, BRD) versiegelt. Es folgten die Fluoreszenzmikroskopie und die Aufnahme der zweiten Bilderserie der Gewebeschnitte unter dem 20x Objektiv. Die Bilder der ersten Serie wurden mit den Bildern der zweiten Serie im Adobe PhotoShop® (5.02, Adobe Systems Incorporated) überlagert. Die Bilder wurden mit einer einheitlichen Bildbreite von 8 cm und einer Auflösung von 300 dpi gespeichert.

Von den mittels FB retrograd markierten Nervenzellen wurden M2R positive und negative Zellen identifiziert und gezählt. Bei sichtbarem Zellkern wurde zusätzlich die durchschnittliche Größe der Zelle bestimmt, indem der Mittelwert aus dem größten und dem kleinsten Durchmesser gebildet wurde. Der tatsächliche Zelldurchmesser konnte mit Hilfe eines Maßstabs berechnet werden, der unter dem 20x Objektiv bei Verwendung der genannten Bildeinstellungen aufgenommen wurde.

Für die Datenerhebung wurden Gewebeschnitte der DRGs L6 und S1 von 5 Mäusen untersucht, statistische Erhebungen wurden mit der SPSS Software durchgeführt. Durch Anwendung des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurde überprüft, ob das Auftreten von M2R-positiven und M2R-negativen Zellen der retrograd markierten Neurone stochastisch unabhängig ist (Unabhängigkeitstest). Die ermittelten Zellgrößen wurden in zwei Gruppen (M2R-positiv und M2R-negativ) verglichen und mit dem Mann-Whitney Test überprüft, ob große und kleine Zellen in den Gruppen gleich verteilt sind, oder ob ein signifikanter Unterschied besteht.

3 Ergebnisse

3.1 Laserassistierte Mikrodissektionen

3.1.1 Bilddokumentation der Mikrodissektionen

Nach erfolgreicher retrograder Markierung von Afferenzen aus der Harnblase wurden Dil-positive Zellen in Gefrierschnitten der DRGs unter Fluoreszenzanregung identifiziert. Im gleichen Bildausschnitt wurden die Zellen unter Durchlicht mithilfe der im Mikroskop integrierten Software markiert. Dabei wurden möglichst exakt die Zellgrenzen umrandet, um ausschließlich neuronale und keine Satellitenzell-RNA im Probenmaterial zu erhalten. Nach der Markierung folgte das Ausschneiden der Zellen mit dem integrierten Laser automatisch. Die Zellen wurden nicht komplett umrandet, sondern es wurde eine Gewebebrücke belassen, um diese nicht zu verlieren. Anschließend wurde für den „Katapult“ eine weitere Markierung im Bereich der Gewebebrücke gesetzt und die Zelle in den wenige Millimeter entfernten Deckel eines Reaktionsgefäßes geschossen. Übrig blieb ein ausgestanzter Gewebeschnitt (Abb. 2).

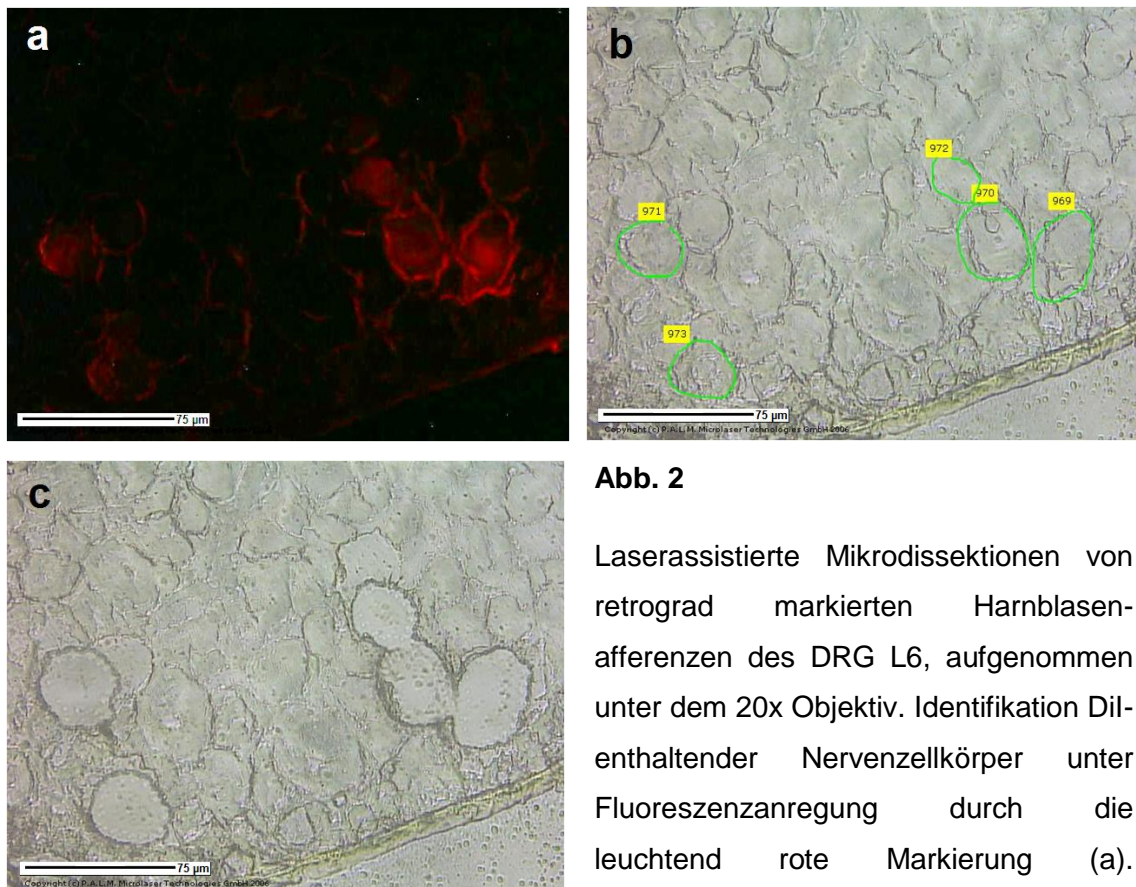


Abb. 2

Laserassistierte Mikrodissektionen von retrograd markierten Harnblasenafferenzen des DRG L6, aufgenommen unter dem 20x Objektiv. Identifikation Dil-enthaltender Nervenzellkörper unter Fluoreszenzanregung durch die leuchtend rote Markierung (a). Festlegung der Laserführung für die

Dissektion durch manuelle Umrundung der Zelle unter Durchlicht (b). Nachdem die

ausgeschnittenen Zellen mit dem LPC-Katapult in den Deckel des Reaktionsgefäßes geschossen wurden, bleibt ein ausgestanztes Gewebe ohne die retrograd markierten Zellen übrig (c).

Mit den Kontrollgeweben (GCS und Trachealepithel) wurde in gleicher Weise verfahren. Die Trachealepithelzellen wurden vor dem Katapultieren in Gruppen ausgeschnitten (Abb. 3). Für eine Probe wurden insgesamt Epithelzellen von 1-2 transversalen Gefrierschnitten gesammelt. Bei den Dissektionen wurde auch darauf geachtet, möglichst wenig genomische DNA in die Proben aufzunehmen bzw. diese vorher zu zerstören. Da die Kerne bevorzugt nahe der Basallamina liegen, wurde die Schnittführung des Lasers durch diese Zone gewählt.

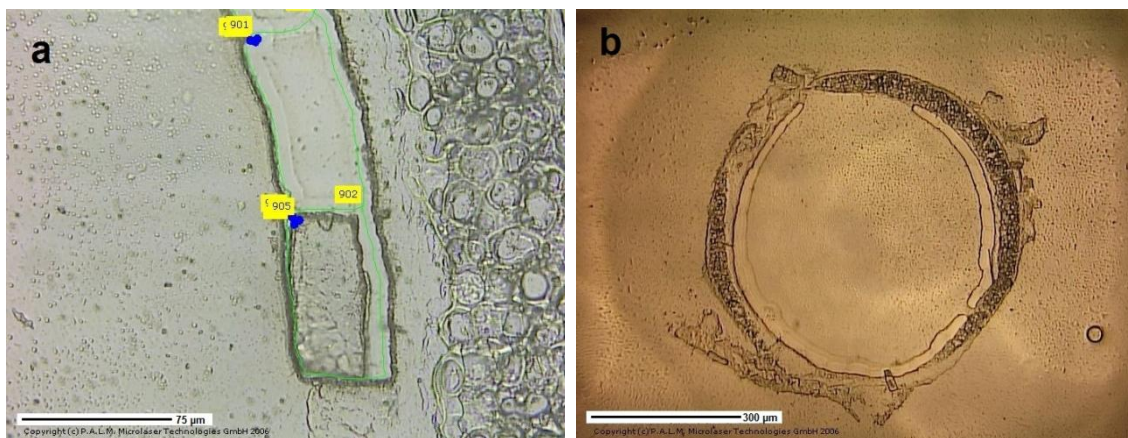


Abb. 3 Anschnitt der Trachea unter Durchlicht während und nach den Mikrodissektionen. Das Trachealepithel wurde mit dem LPC-Lasermikroskop in rechteckförmige Gewebelöcke portioniert und anschließend mit dem Laser-Katapult in den Deckel des Reaktionsgefäßes geschossen. Unter dem 20x Objektiv ist ein solcher Gewebelöckchen erkennbar (a). Unter dem 5x Objektiv ist der ausgestanzte Epithelring nach Durchführung der Mikrodissektionen im Transversalschnitt der Trachea erkennbar (b).

3.1.2 RT-PCR der Kontrollen

Für die Positivkontrolle des M1R wurden von Gefrierschnitten des GCS 10-50 Nervenzellanschnitte in aufsteigenden Zehnerschritten in 5 Proben gesammelt. Dieser Schritt diente zur Ermittlung der erforderlichen Zellzahl, die zu einem positiven RT-PCR Ergebnis bei hoher Rezeptor-Expression führt. Als Positivkontrolle für den Nachweis geringer Mengen amplifizierter DNA diente das „Housekeeping Gene“ BMG. Zum Ausschluss genomischer DNA wurde bei jeder Probe zusätzlich eine Negativkontrolle ohne RT aufgetragen (Kapitel 2.2.4). Bereits bei sehr geringem Zellmaterial (10 Zellanschnitte) konnte, wie auch bei allen anderen Proben, ein Amplifikat mit dem

BMG-Primer nachgewiesen werden. Dieser Befund belegt das Vorhandensein von Zellmaterial und den Erfolg aller in Kapitel 2.2 genannten Schritte. Im rechten Bildabschnitt des in Abb. 4 gezeigten Gels sieht man bei 30 Zellanschnitten (hier als „Zellen“ bezeichnet) noch eine weitere dünne Bande bei 400 bp. Hier könnte eine Splice-Variante des BMG-Gens amplifiziert worden sein. Mit dem M1R-Primer wurden Amplifikate bei 40 und 50 Zellen nachgewiesen. Genomische DNA kann ausgeschlossen werden, da alle Negativkontrollen ohne reverse Transkription keine Bande zeigten (Abb. 3).

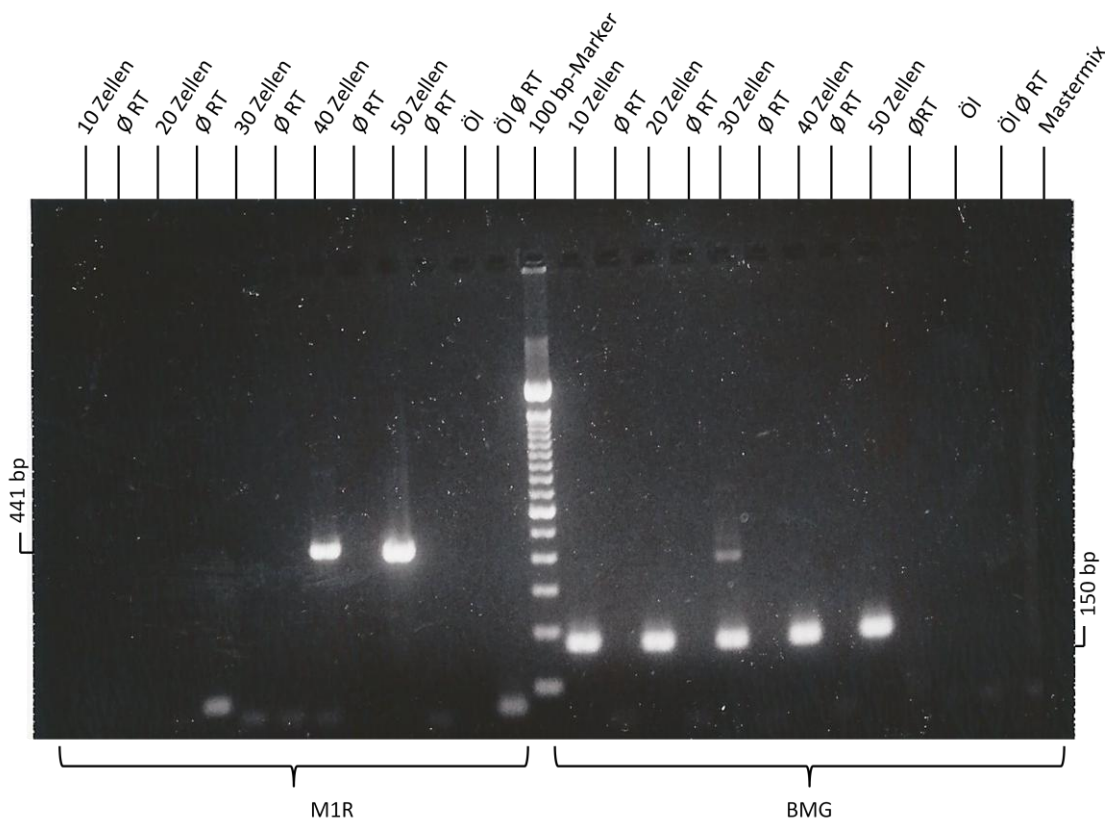


Abb. 4 RT-PCR. Das Agarosegel zeigt amplifizierte DNA der Positivkontrollen von Mikrodissenktionen aus dem GCS. Im linken Abschnitt Nachweis des M1R bei 40 und 50 Zellen. In der Mitte befindet sich der 100 bp-Marker, im rechten Bildabschnitt wurde für alle Proben (10-50 Zellen) transkribierte DNA mithilfe des Housekeeping-Gens BMG nachgewiesen. Ø RT= Kontrollprobe mit Auslassung der reversen Transkriptase. Alle Negativkontrollen (Ø RT, Öl, Öl Ø RT, Mastermix) zeigen keine Bande, wodurch genomische DNA und eine Kontamination der Ölkontrollen und des Mastermix ausgeschlossen werden kann.

Für die Positivkontrolle des M3R wurden Mikrodissektionen von Trachealepithelzellen vorgenommen. Um diesen Rezeptor sicher nachzuweisen, wurden Epithelzellen von 1-2 Transversalschnitten der Trachea benötigt (Abb. 2). Abb. 5 zeigt das Agarose-Gel der amplifizierten DNA aus Trachealepithelzellen eines Transversalschnittes. Auch hier wurde zum Nachweis geringer Mengen transkribierter cDNA der BMG-Primer eingesetzt. Die zwei kräftigen Banden im Bereich 150 bp (BMG) und 244 bp (M3R) dokumentieren die Expression beider Gene. Bei jeder Probe wurde zusätzlich rechts neben dem Positiv-Ansatz eine Negativkontrolle ohne RT aufgetragen (Kapitel 2.2.4). Hier zeigen sich keine Banden, was die Amplifizierung genomischer DNA ausschließt.

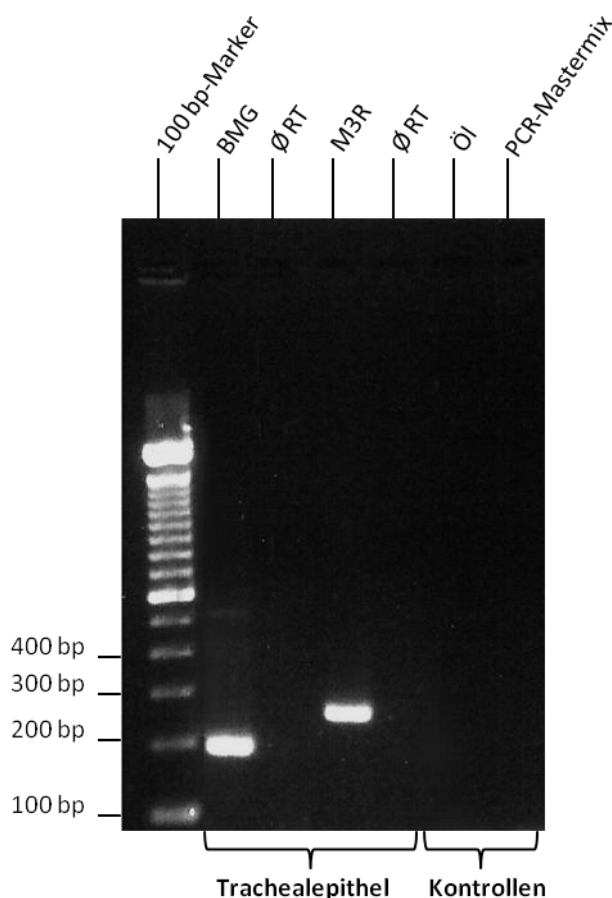


Abb. 5 RT-PCR. Das Agarose-Gel zeigt amplifizierte DNA aus Trachealepithelzellen. Links im Bild befindet sich der 100 bp Marker. Aufgetragen wurden BMG- und M3R Amplifikate sowie die Negativkontrollen. Ø RT= Kontrollprobe mit Auslassung der reversen Transkriptase. Es zeigen sich Banden bei BMG und M3R. Die Negativkontrollen zeigen keine Bande. Durch das Fehlen eines Amplifikates bei der Ölkontrolle, Mastermix und Ø RT ist eine Kontamination durch genomische DNA ausgeschlossen.

3.1.3 RT-PCR retrograd markierter und nicht-markierter Neurone

Nach diesen Vorversuchen wurden Mikrodissektionen sowohl an Dil-markierten Nervenzellen aus DRGs als auch, wie oben beschrieben, an den Kontrollgeweben durchgeführt. Aus dem Ganglion S1 wurden zunächst zwei Proben mit jeweils 30 und

40 Zellen angefertigt und später zu einer Probe gepoolt. Der Vorteil ist, dass eine größere Menge an RNA zur weiteren Analyse zur Verfügung steht. Eine weitere Probe enthielt 50-70 Zellen, die keinen Dli-Tracer enthielten. Bei jeder Probe wurde zusätzlich neben dem Positiv-Ansatz eine Negativkontrolle ohne RT aufgetragen (Kapitel 0). In Abb. 6 wird die hohe Aussagekraft bezüglich der Expression der genannten Targets deutlich. In allen Mikrodissektionen von Ziel- und Kontrollgeweben wurde transkribierte RNA nachgewiesen, sichtbar an den Banden für BMG. Kontaminationen und eine Amplifikation genomischer DNA sind durch fehlende Banden bei allen Negativansätzen (ohne RT, Öl und Mastermix) ausgeschlossen. Der Nachweis der spezifischen Genexpression in den Kontrollgeweben (M3R im Trachealepithel und M1R im GCS) ist ein weiteres, notwendiges Qualitätsmerkmal und zeigt, dass die gewählte Methode zur Detektion der Expression dieser Gene geeignet ist. Der Hauptbefund dieses Experimentes ist der Nachweis einer Genexpression für den M3R in retrograd markierten Nervenzellen. Eine Genexpression für den M1R konnte in retrograd markierten Zellen nicht gezeigt werden. Ebenso kann keine Genexpression beider Targets in nicht retrograd markierten Zellen gefunden werden.

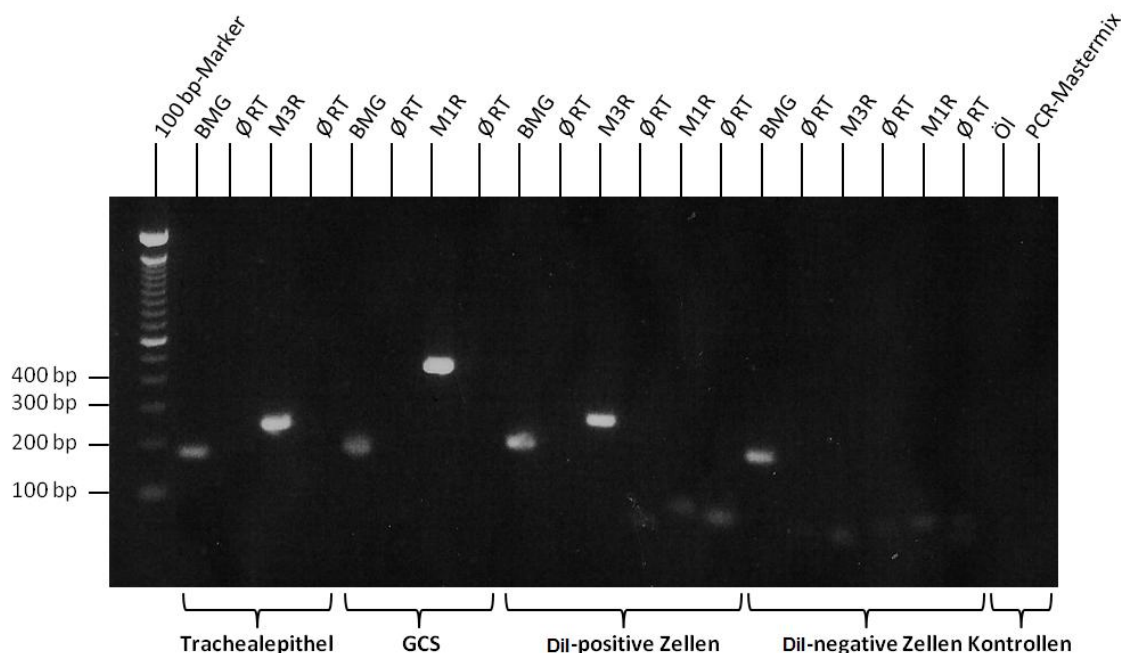


Abb. 6 RT-PCR. Agarose-Gel von amplifizierter DNA aus Trachealepithelzellen, GCS, Dil-markierten und nicht-markierten Nervenzellen aus dem Ganglion S1 sowie die Negativkontrollen ohne RT für Öl und den PCR-Mastermix. In allen Geweben zeigt sich eine Bande bei BMG. Die Positivkontrollen aus dem Trachealepithel und GCS zeigen zudem Banden bei 244 bp (M3R) bzw. 441 bp (M1R). In Dil-positiven Nervenzellen

zeigt sich eine Bande bei BMG und M3R. In Dil-negativen Nervenzellen ist nur bei BMG eine Bande sichtbar. Alle Negativkontrollen zeigen keine Bande.

3.2 Fluoreszenzmikroskopie

3.2.1 Kontrollgewebe

Vor Anfertigung der ersten Bilderserie und den immunhistochemischen Inkubationen wurde der Erfolg des retrograden Neurotracings kontrolliert. Dazu wurden Kryoschnitte der Harnblasenwand und des thorakolumbalen Rückenmarks unter UV-Anregung betrachtet. Der Nachweis des Neurotracers in der Harnblasenwand diente als Positivkontrolle der Tracerapplikation und konnte bei jedem Versuch dargestellt werden. Die zweite Voraussetzung für die Verwendung der DRGs in der Fluoreszenzmikroskopie war der Ausschluss des Tracers im thorakolumbalen Rückenmark. Diese Negativkontrolle diente einerseits dem Ausschluss von Verfälschungen durch systemischen Übertritt des Neurotracers und diffuser Aufnahme durch sämtliche Nervenzellen. Andererseits sollte gezeigt werden, dass kein synaptischer Übertritt stattgefunden hat, was eine Anreicherung weiterer durch Interneurone verknüpfte Neuronengruppen nach sich ziehen und die eindeutige Identifikation von Afferenzen der Harnblase kompromittieren würde. In einem Versuch wurde eine diffuse Anreicherung des Tracers im Rückenmark, aber auch in den DRGs beobachtet. Dies konnte am ehesten durch einen systemischen Übertritt des Tracers während der Applikation erklärt werden. Gewebeproben aus diesem Versuch wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Bei allen anderen Versuchen wurde ein Übertritt des Tracers in das Rückenmark nicht beobachtet, wodurch das Einschlusskriterium für die Auswertung erfüllt war.

3.2.2 DRG

Anhand der sukzessiven Bilddokumentation (Abb. 7) kann neben der Befunderhebung auch der methodische Ablauf nachvollzogen werden. Die erste Bilderserie der DRGs wurde vor immunhistochemischen Inkubationen angefertigt, unmittelbar nachdem die Gelfrierschnitte vollständig auf Objektträger gezogen wurden. Alle Schnitte wurden unter UV-Anregung nach FB-positiven Zellen abgesucht und nur jene Schnitte fotografiert, die eine Anreicherung des Tracers in Nervenzellen zeigten. Solche Nervenzellen sind unter UV-Anregung an der intensiven Blaufärbung zu erkennen und werden somit eindeutig Harnblasenafferenzen zugeordnet. Es zeigte sich auch eine Anreicherung des Tracers in den umgebenden Satellitenzellen. Dies könnte durch

Diffusion oder thermische Einflüsse nach Aufziehen der Schnitte auf den Objektträger zustande gekommen sein. Für die Qualität einer sauberen Applikation des Tracers spricht die isolierte Markierung einzelner Neuronengruppen ohne diffuse Färbung aller Neurone oder des Bindegewebes. Um eine spätere Zuordnung der FB-markierten Nervenzellen im Gewebekontext zu ermöglichen, wurde unmittelbar eine zweite Aufnahme mit dem FITC-Filterset vorgenommen, bei der die Autofluoreszenz des Gewebes abgebildet wurde. Die Bilder wurden entsprechend nummeriert, um sie später den passenden Bildern nach der Immuninkubation zuzuordnen. Die nächste Bilderserie wurde nach der immunhistochemischen Markierung (Kapitel 2.3.1) angefertigt. Es wurden nur jene Gewebeschnitte verwendet, die zuvor FB-positive Zellen zeigten. Der Cy3-konjugierte Sekundärantikörper wird bei entsprechenden Filtereinstellungen (Kapitel 2.3.1, Tabelle 6) sichtbar. Für die Qualität der Immunmarkierung spricht, dass eine gute Kontrastierung zwischen M2R-positiven und M2R-negativen Zellen besteht, und dass das Gewebe nach den Waschvorgängen weitgehend die Form behalten hat. Um zu vergleichen, ob Harnblasenafferenzen den M2R exprimieren, wurden die Bilder der ersten Serie mit denen der zweiten Serie überlagert. Mit dieser Untersuchung gelang der Nachweis einer M2R-Expression in Harnblasenafferenzen. Für die Auswertung wurden bei 5 Tieren insgesamt 235 FB-positive Zellen mit Kernanschnitt in 6 L6-Ganglien und 186 FB-positive Zellen in 8 S1-Ganglien ermittelt. Die Anzahl der FB-positiven Zellen, die den genannten Qualitätskriterien entsprechen, ist bei diesen Ganglien sehr variabel. Extremwerte zeigten sich im rechten L6 Ganglion von Tier 2 bei 102 FB-positiven Zellen und im rechten S1 Ganglion bei 4 FB-positiven Zellen. Ausgeschlossen wurden 4 L6 Ganglien und 2 S1 Ganglien, die keinen Tracer enthielten, eine unspezifische immunhistochemische Markierung oder aufgrund der Präparation und thermischen Einflüssen eine zerstörte Gewebearchitektur zeigten. Das wichtigste Ergebnis dieser Versuchsreihe ist der Nachweis der Expression des M2R an Afferenzen der Harnblase. Von 421 FB-positiven Zellen zeigten 148 Zellen (35,2%) eine M2R-Immunreaktivität.

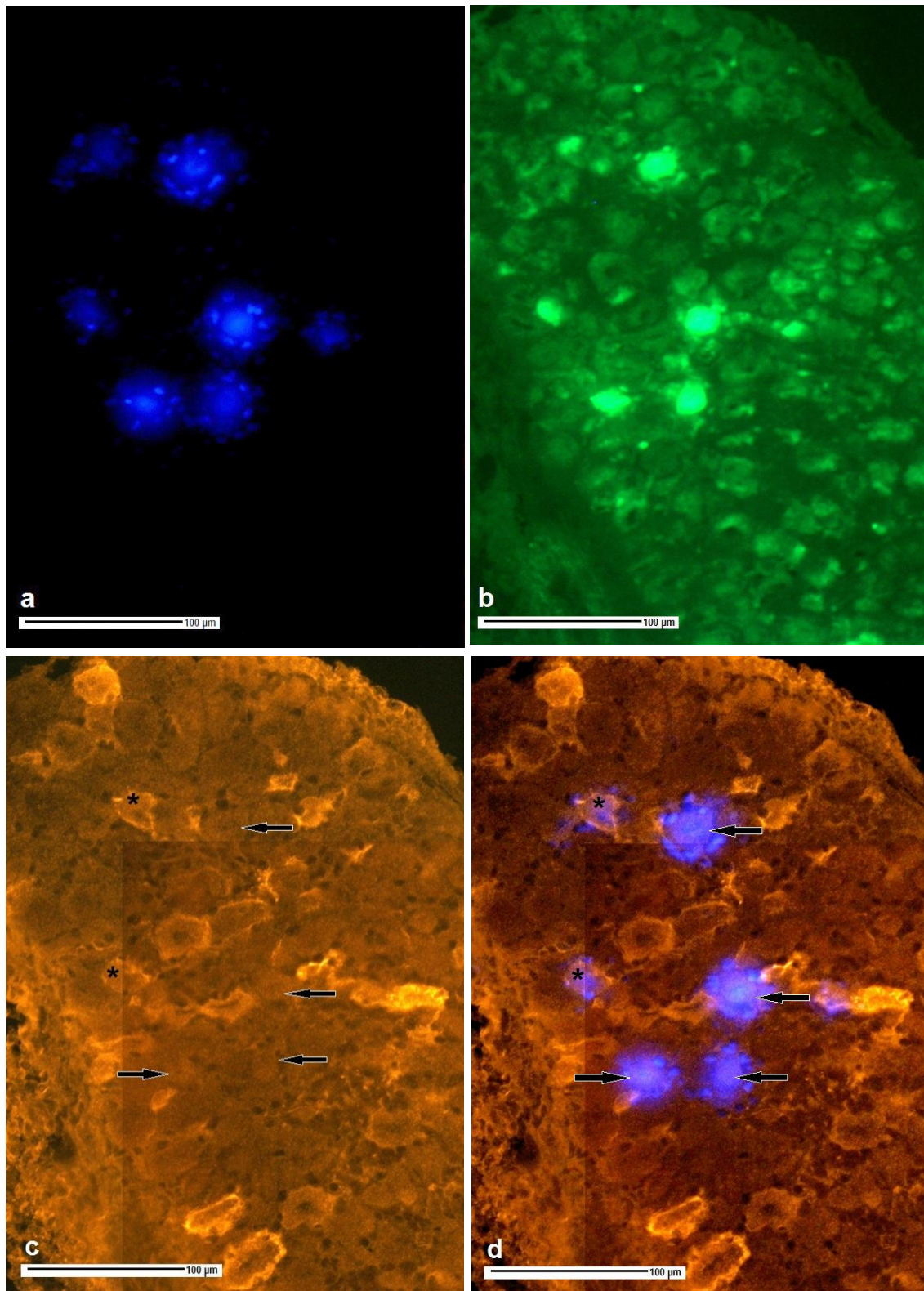


Abb. 7 Ausschnitt eines Gefrierschnittes des DRG L6 von der Maus nach retrograder Markierung afferenter Neurone (Kapitel 2.1.2), fotografiert unter dem 20x Objektiv bei UV-Anregung. Sichtbar sind sieben Nervenzellen, die den FB Tracer aufgenommen haben. Nervenzellkörper umgebende Satellitenzellen zeigen ebenfalls den Tracer (a).

Bei Anregung mit dem FITC-Filterset wird das gesamte Gewebe aufgrund der Auto-fluoreszenz sichtbar. FB enthaltende Nervenzellkörper zeigen eine stärkere Fluoreszenz (b). Nach Immuninkubation mit dem M2R-Antikörper werden M2R-positive Zellen durch die gelb-orange Membranfärbung sichtbar. Diese grenzen sich in ihrer Markierungsintensität von M2R-negativen Zellen ab. In einigen Zellen sind die Kerne angeschnitten, die sich etwas dunkler vom Zytoplasma abheben (*). Die Pfeile zeigen auf M2R-negative Zellen, wovon bei zwei Zellen (obere Pfeile) ein angeschnittener Kern zu sehen ist (c). Nach exakter Lokalisation im Gewebekontext wurden Bildausschnitte a und c überlagert (d). Erkennbar ist bei zwei Zellen eine Übereinstimmung von FB-enthaltenden und M2R-positiven Zellen (*), die einen Kernanschnitt zeigen. Sichtbar ist auch eine Übereinstimmung von vier FB-enthaltenden und M3R-negativen Zellen (Pfeil).

Zur genaueren Quantifizierung wurden für die statistische Auswertung folgende Messungen vorgenommen: Um zu vermeiden, dass identische Nervenzellkörper aufgrund ihrer Größe bei einer Gewebeschichtdicke von 10 μm in angrenzenden Schnitten mehrfach gezählt werden, wurden für die Auswertung nur kernhaltige Zellen eingeschlossen. Da lediglich die Harnblasenafferenzen von Interesse waren, wurde bei FB-positiven, kernhaltigen Zellanschnitten die Zellgröße bestimmt (Kapitel 3.3) und der M2R-Nachweis erfasst. Damit sollte untersucht werden, ob ein morphologisches Korrelat der C-Faser- und A δ -Afferenzen der Harnblase mit einer M2R-Expression besteht.

3.3 Zellgrößen FB-positiver Neurone

Insgesamt wurden 421 FB-positive, kernhaltige Zellanschnitte in den DRGs L6 und S1 von 5 Tieren zur Größenbestimmung herangezogen, bei denen eine eindeutige Zuordnung FB-positiver Zellen im Gewebekontext nach Immuninkubation mit dem M2R-Antikörper möglich war. M2R-positive Neurone wiesen einen Median und mittlere Größe von 19 μm ($\pm 6 \mu\text{m}$, S.D.) auf, M2R-negative einen Median von 19 μm bei einem Mittelwert von 20 μm ($\pm 6 \mu\text{m}$, S.D.). Zwischen diesen Gruppen bestand kein signifikanter Größenunterschied ($p=0,231$, Mann-Whitney-Test). Abb. 8 zeigt die Größenverteilung FB-positiver DRG-Neurone in 5 μm Intervallen, kategorisiert in M2R-positive und M2R-negative Zellen. Es ergibt sich eine linksgipfelige Häufigkeitsverteilung, wobei sich in beiden Kategorien ein Häufigkeitsmaximum zwischen 15 und 19,9 μm Zelldurchmesser findet. Entsprechend zum Vergleich der einzelnen Zellgrößen zeigt auch die relative Häufigkeit markierter Neurone in den einzelnen Größenklassen keinen signifikanten Unterschied zwischen M2R-positiven

und M2R-negativen Zellen ($p=0,28$, χ^2 -Test). Deutlich wird auch, dass durch das retrograde Tracing mehr kleine als große Perikarya markiert wurden.

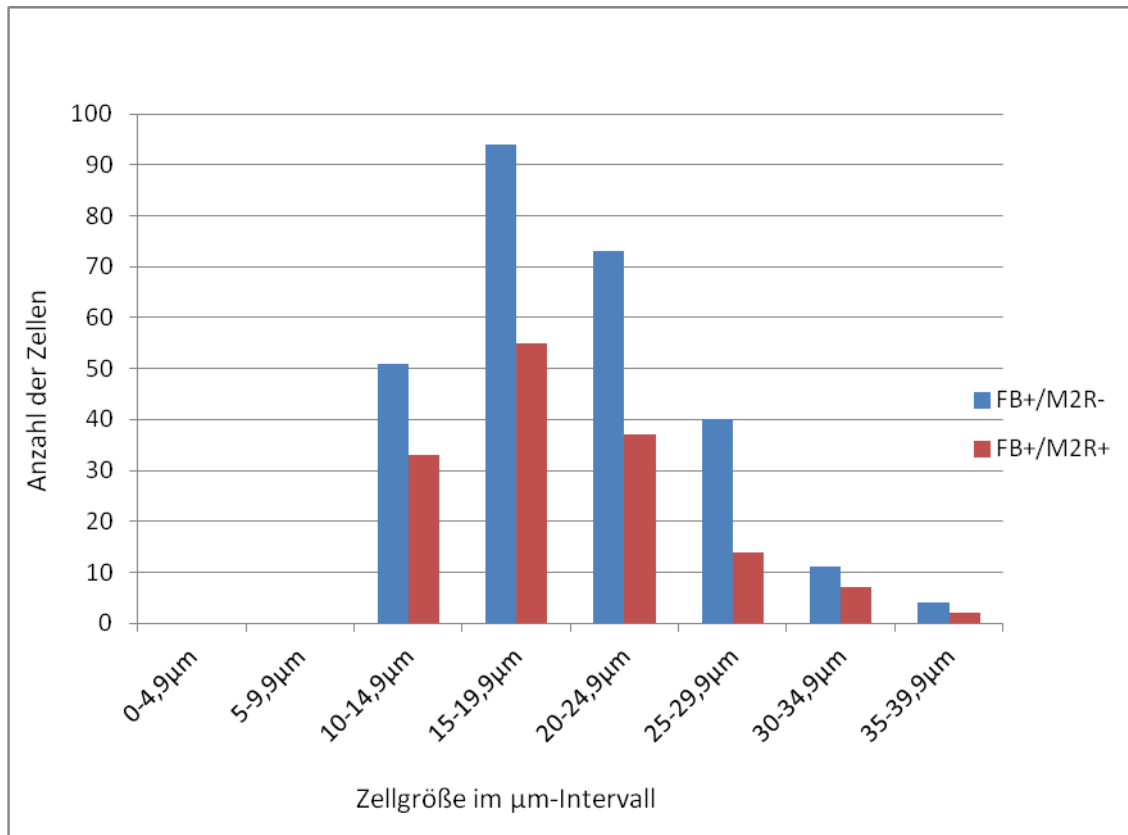


Abb. 8 Darstellung der Häufigkeit FB-positiver Zellen, mit und ohne den M2R, geordnet nach Zellgröße in 5 μm -Intervallen. Das Häufigkeitsmaximum liegt bei einer Zellgröße von 15-19,9 μm für M2R-positive ($n= 55$) und M2R-negative Zellen ($n=94$).

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden gemeinsam mit weiteren Daten veröffentlicht (Nandigama et al., 2010). In dieser Studie konnte erstmals eine genaue Aussage über die Expression von mAChR-Subtypen in Harnblasenafferenzen getroffen werden. Dies gelang durch eine Kombination von immunhistochemischer Markierung und Laser-assistierten Mikrodissektionen mit nachfolgender RT-PCR von retrograd markierten afferenten Neuronen der Harnblase.

4.1 Untersuchung der DRG L6 und S1

In früheren neuroanatomischen Studien von Applebaum et al. (1980) und Wang et al. (1998) wurden die meisten von der Harnblase aus retrograd markierten Nervenzellkörper bei Ratten in den Spinalganglien L1 und L2 sowie L6 und S1 gefunden. In Übereinstimmung wurden in unserer gemeinsamen Studie die meisten Perikarya der Harnblasenafferenzen von Mäusen ebenfalls in den Ganglien der Spinalsegmente L6 und S1, sowie eine kleinere Ansammlung bei L1 und L2 lokalisiert. Afferente Nervenfasern, die den Spinalganglien L1 und L2 entspringen, werden in lumbalen Nn. splanchnici zur Harnblase geleitet. Harnblasenafferenzen mit dem Ursprung in den Spinalganglien L6 und S1 werden den pelvinen Afferenzen zugeordnet (Xu und Gebhart, 2008). Lumbale Nn. splanchnici und pelvine Afferenzen sind Leitungsbahnen, die sich in ihrer Zusammensetzung an afferenten Neuronenklassen unterscheiden. „Serosa-Afferenzen“ und Nervenfasern mit „Muskel-Mechanorezeptoren“ sind in beiden Leitungsbahnen, Nervenfasern mit „Muskel-Mukosa-“, und „Mukosa-Mechanorezeptoren“ nur in pelvinen Afferenzen vertreten (Xu und Gebhart, 2008). In unserer Studie (Nandigama et al., 2010) lagen die Spinalganglien L6 und S1 aus folgenden Gründen im Fokus: Nur in der pelvinen Leitungsbahn sind Nervenfasern enthalten, deren Rezeptoren sich im Urothel befinden (Mukosa-Mechanorezeptoren). In einem systematischen Überblick aus Studien von 1966-2003 stellten Brazzelli et al. (2006) bei der Dranginkontinenz einen therapeutischen Benefit durch elektrische Stimulation dieser Leitungsbahnen, vergleichbar mit einer anticholinergen Therapie, heraus. Ein weiteres Argument für die Untersuchung afferenter Neurone aus den Spinalganglien L6 und S1 ist durch aktuelle technische Grenzen gegeben. Für den sicheren Nachweis von mAChR-mRNA mit anschließender RT-PCR aus laserassistierten Mikrodissektionen wurde eine Menge an Genmaterial benötigt, die nahezu der Gesamtzahl der retrograd markierten Zellen im Spinalganglion L1 und L2 entsprechen würde. Daher wäre es praktisch unmöglich, in

dem engen Zeitfenster genügend Zellmaterial für sichere RT-PCR-Analysen zu erhalten.

4.2 Aussagekraft und Grenzen der nachgewiesenen mAChR-Expression mittels Immunhistochemie

Pradidarcheep et al. (2008) und Jositsch et al. (2009) testeten alle eingesetzten mAChR-Antikörper an Geweben von Knockout-Mäusen und zeigten, dass trotz entsprechendem Gendefekt mit dem jeweiligen Antikörper verschiedene Zellpopulationen in der Fluoreszenzmikroskopie, mit Ausnahme des hier verwendeten monoklonalen M2R-Antikörpers, sichtbar waren. Dieses Erkenntnis hatte entscheidenden Einfluss auf die hier angewandte Methodik. Durch Verwendung des einzig verfügbaren spezifischen M2R-Antikörpers in der immunhistochemischen Markierung retrograd markierter afferenter Neurone konnte das Vorkommen dieser Rezeptoren auf Einzelzellebene gezeigt werden. Für den sicheren Nachweis der anderen mAChR-Subtypen wurden Mikrodissektionen retrograd markierter Neurone mit anschließender RT-PCR eingesetzt. Ob ein einzelnes afferentes Neuron nur einen mAChR-Subtyp, oder simultan eine Kombination mehrerer mAChR-Subtypen exprimiert, konnte aufgrund methodischer Grenzen nicht geklärt werden. Grund ist, dass die häufig eingesetzten Antikörper gegen mAChR-Subtypen (M1R, M3R, M4R und M5R) nicht monospezifisch sind. Rückschlüsse auf eine mögliche Co-Expression von mehr als einem mAChR-Subtyp in einer einzelnen Zelle sind daher nicht möglich. Aufgrund der funktionellen Vielfalt der Harnblasenafferenzen lassen die in dieser Arbeit vorliegenden Daten nur eine begrenzte Interpretation bezüglich der Funktion von exprimierten mAChRs zu.

4.3 Aussagekraft und Grenzen der nachgewiesenen mAChR-Expression mittels laserassistierter Mikrodissektion und nachfolgender RT-PCR

Für den spezifischen Nachweis der mAChR-Subtypen M1R und M3R-M5R wurden Mikrodissektionen retrograd markierter Harnblasenafferenzen mit nachfolgender RT-PCR eingesetzt. Um diese Methode erfolgreich einzusetzen, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein: Die Gewebemorphologie muss geeignet sein, um eine ausreichende Menge einzelner Zellanschnitte aus dem Gewebe herauszulösen. Weiterhin sind eine intakte Gewebeintegrität und eine hohe biologische Verfügbarkeit von RNA im Dissektionsmaterial entscheidend. Die angefertigten Kryoschnitte von

Spinalganglien erwiesen sich für diese Methodik als geeignet. Erstens blieb der Zellverband nach der Gewebeeinbettung, Schockfrieren und Anfertigung von Serengefrierschnitten (siehe II.1.4 und II.2.1) intakt. Zudem ist bekannt, dass die Verwendung von schockgefrorenem Gewebe gegenüber Paraffineinbettung eine höhere Qualität und Quantität der isolierten RNA gewährleistet (Goldsworthy et al. 1999). Zweitens ist die Gewebestruktur von Kryoschnitten aus Spinalganglien übersichtlich. Zellgrenzen der Nervenzellkörper und umgebende Satellitenzellen können lichtmikroskopisch auch ohne Anfärbung mit Hämalaun erkannt werden. Auf die Anfärbung mit Hämalaun wurde verzichtet, um die RNA-Degradierung zu reduzieren (Wang et al., 2006). Ein weiterer Grund war das Herauslösen des Neurotracers aus den Kryoschnitten, wodurch eine Identifikation retrograd markierter Zellen kompromittiert wurde. Drittens: Eine wesentliche biologische Eigenschaft von Neuronen ist ein hoher Protein- und Membranumsatz, ermöglicht durch entsprechende Verfügbarkeit von mRNA. Nachteil dieser Methode ist, dass das Ergebnis der folgenden RT-PCR wesentlich von der Menge und Qualität der extrahierten RNA aus gewonnenem Zellmaterial abhängig ist (Copois et al. 2007; Goldsworthy et al. 1999). Aufgrund der raschen RNA-Degradierung in avitalem Gewebe bei Zimmertemperatur mussten die Dissektionen in einem Zeitfenster von ca. 20 Minuten abgeschlossen sein. Dies kann auch den routinierten Mikroskopeur vor eine Herausforderung stellen. Das Fehlen von Introns in Genomen von mAChRs erforderte den Einsatz von nicht-intronumspannenden Primerpaaren in der PCR. Während der RNA-Isolierung wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um die in den Proben enthaltene genomische DNA zu eliminieren. Nach der anschließenden Transkription enthielten die Proben daher für die PCR ausschließlich ein Produkt aus dem mRNA-Transkript (cDNA). Die RNA-Isolierung und der DNase-Verdau wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt und könnten zu einem weiteren Verlust von mRNA, beispielsweise durch ubiquitär vorkommende RNAsen, geführt haben. Aus diesen Gründen war es notwendig, die Kombination von Mikrodissektionen mit anschließender RT-PCR für den Nachweis geringer Mengen an Genmaterial zu weiter etablieren. Interne Standards für diese Methodik erarbeiteten Fink et al., 1998, 2000. Die erfolgreiche Amplifizierung geringer Mengen mRNA (50 Zellanschnitte) aus gefrorenem Gewebe erforderte insbesondere für die Präparation und Isolierung der RNA ein spezifisches Protokoll (Fink und Bohle, 2005), welches in dieser Arbeit Anwendung fand. Der Erfolg bei der Aquisierung von geringen Mengen Genmaterial und allen weiteren methodischen Schritten (siehe Kapitel 2.2) wurde bei allen Proben durch den erwartungsgemäßen Nachweis eines Amplifikates mit dem BMG-Primer dokumentiert. In Kapitel 3.1.2 wurde gezeigt, dass in einem Gewebe mit hoher Expression des M1R das Genmaterial von mindestens 40

Zellanschnitten für den sicheren Nachweis des M1R erforderlich ist. Dies entspricht der RNA-Menge von etwa 13 Nervenzellkörpern, wobei der thermisch bedingte RNA-Verlust durch das Ausschneiden der Zellen nicht berücksichtigt ist. Der fehlende Nachweis des M1R in den Proben mit 10, 20 und 30 Zellen ist durch die für die Methode zu geringe Menge an Genmaterial erklärt. Zudem ist der erwartungsgemäße Nachweis einer M3R-Expression in Trachealepithelzellen aus Mikrodissektionen von 1-2 Transversalschnitten der Trachea dokumentiert. Rückschlüsse auf eine erforderliche Menge von Genmaterial aus Nervenzellanschnitten zum sicheren Nachweis des M3R lassen sich nicht ziehen, es wurde aber in diesem Kontext angenommen, dass für die mRNA des M1R und den M3R die gleiche Nachweisgrenze gilt, also das Genmaterial von mindestens 40 Zellanschnitten erforderlich ist. Diese Ergebnisse etablierten einerseits die angewandte Methodik, andererseits dienten sie der Positivkontrolle für eine Expression des M1R und M3R bei anschließender Untersuchung der Rezeptorexpression von retrograd markierten Nervenzellkörpern von Harnblasenafferenzen. In Kapitel 3.1.3 ist der Nachweis einer M3R-Expression in retrograd markierten Harnblasenafferenzen dokumentiert. Das entsprechende Amplifikat wurde aus dem Genmaterial von ca. 70 retrograd markierten Zellanschnitten in einer gepoolten Probe erzeugt. Neben dem qualitativen Nachweis einer M3R-Expression lassen sich keine Rückschlüsse auf Stärke der Expression einzelner Neurone oder den Anteil exprimierender- und nicht-exprimierender Neurone ziehen. In Kapitel 3.1.3 ist der fehlende Nachweis einer M1R-Expression in retrograd markierten Harnblasenafferenzen aus dem Genmaterial von ca. 70 retrograd markierten Zellanschnitten dokumentiert. Dieses Ergebnis lässt jedoch keine Aussage hinsichtlich einer M1R-Expression einzelner, weniger Neurone unterhalb der Nachweisgrenze in dieser Zellpopulation zu.

4.4 Bedeutung des Urothels bei der Entstehung und Modulation afferenter Impulse

Bei der Entstehung und Modulation afferenter Impulse aus der Harnblase spielt das Urothel eine zentrale Rolle, da es auf struktureller und molekularer Ebene sensorische Eigenschaften aufweist und eine epithelioneuronale Kommunikation angenommen wird. Grundlegende Erkenntnisse hierzu sind in Kapitel 1.10 aufgeführt. Verschiedene Studien zeigen, dass Muskarinrezeptor-Antagonisten eine Hemmung der Aktivität von Harnblasenafferenzen hervorrufen (Kim et al., 2005; De Laet et al., 2006; Iijima et al., 2007; Matsumoto et al., 2010), wodurch sich der therapeutische Effekt von oralen Anticholinergika erklären könnte.

Neben der Möglichkeit einer direkten Erregung sensorischer Afferenzen könnte der Agonismus an mAChR anderer oberflächennaher Strukturen (Urothelzellen und Myofibroblasten) die Erregbarkeit afferenter Nervenfasern durch eine Freisetzung von NO und ATP beeinflussen. Kullmann et al. (2008b) zeigten, dass eine unselektive Stimulation funktioneller M1R, M2R und M3R an kultivierten Urothelzellen zu einer Freisetzung von ATP führt. Eine weitere Studie von Kullmann et al. (2008a) zeigte, dass die intravesikale Instillation des hydrophilen, unselektiven Muskarinrezeptor-Agonisten Oxotremorin-Methiodid (OxoM) in hoher Konzentration (40 μ M) zu einer gesteigerten reflektorischen Detrusoraktivität führt. Die induzierte reflektorische Überaktivität konnte sowohl durch eine zuvor erfolgte Desensibilisierung mit Capsaicin als auch durch Instillation von Atropin-Methylnitrat (AMN), einem nichtselektiven mAChR-Antagonisten vollständig geblockt werden. Diese Beobachtung impliziert eine primäre Beteiligung von C-Faser Afferenzen. Instillation eines nichtselektiven Purinrezeptor-Antagonisten 4-[[4-formyl-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonooxy)methyl]-2-pyridinyl] azo]-1,3-benzenedisulfonic acid tetrasodium salt] (PPADS) bewirkte eine Reduktion der induzierten Detrusorüberaktivität. Die intravesikale Applikation von OxoM in niedriger Konzentration (5 μ M) führte bei Ratten zu einer Reduktion der Miktionsfrequenz. Dieser Effekt konnte durch eine Hemmung der NO-Synthase mit N^ω-Nitro-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid (L-NAME) aufgehoben werden. Dieser Sachverhalt wurde in einer Studie von Yu und De Groat (2010) durch in vitro Untersuchungen am Blase-Nerv-Präparat von Ratten gestützt. Durch muskarinergen Agonismus an der Mukosa wurde ebenfalls eine gesteigerte Erregbarkeit mechanosensitiver Afferenzen gezeigt. Ebenso konnte dieser Effekt durch Applikation von AMN und dem Purinrezeptor-2-Antagonisten 2',3'-O-Trinitrophenyl-ATP (TNP-ATP) auf die Mukosa geblockt werden. Ergänzend fanden Matsumoto et al. (2010), dass die intravesikalen Effekte von OxoM am effektivsten durch lokale Applikation von M2R-bevorzugenden Antagonisten (Dimetindenmaleat und Methoctraminhemihydrat) geblockt werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Erregbarkeit von C-Faser-Afferenzen, hauptsächlich nach Agonismus am M2R, durch urothelial/suburothelial freigesetztes ATP gefördert und durch NO gehemmt wird. Eine Hemmung der Erregbarkeit von Harnblasenafferenzen durch Interaktion von NO an HVACCs wurde durch Yoshimura et al., 2001 beschrieben. Zagorodnyuk et al. (2009) zeigten eine purinerge exzitatorische Modulation bei „stark antwortenden Mukosa-Mechano-Rezeptoren“ und „Muskel-Mukosa-Mechanorezeptoren“. Entsprechend werden verschiedene Subtypen von P2X- und P2Y-Purinrezeptoren in Urothelzellen und Harnblasenafferenzen exprimiert (Birder et al., 2004; Dang et al., 2005; Brederson und Jarvis, 2008). Diese Daten stützen ein integratives Modell einer muskarinergen

und purinergen Interaktion bei der Modulation von afferenten Impulsen bei „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ und „Muskel-Mukosa-Mechanorezeptoren“ unter physiologischen Bedingungen. Purinerge und cholinerge Signalwege und die Interaktion mit Harnblasenafferenzen sind vereinfacht in Abb. 9 dargestellt.

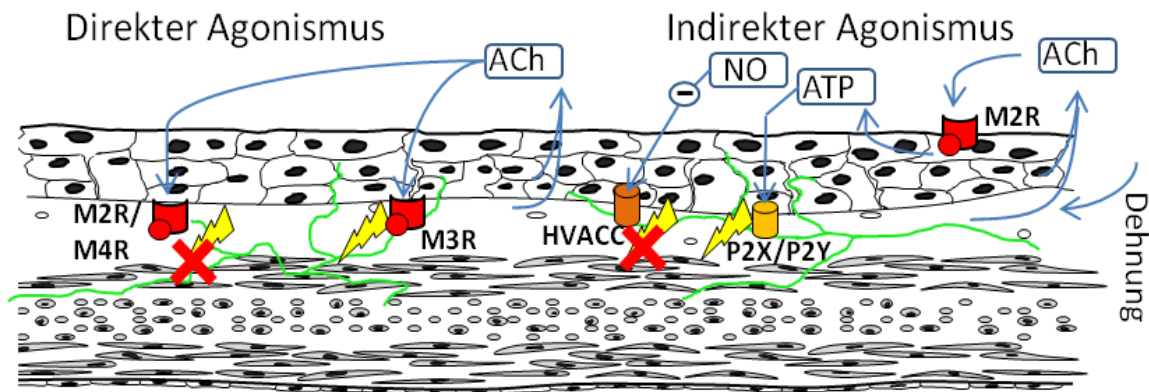


Abb. 9 Darstellung purinerge und cholinerge Signalwege bei der Modulation der Erregung von Harnblasenafferenzen in einem integrativen Modell im schematischen Wandaufbau der Harnblase von Säugetieren (Vergleiche Abb. 1). In hellgrün sind afferente Nervenfasern stilisiert. Durch Dehnung der Mukosa kommt es zur Freisetzung von ACh aus dem Urothel und Suburothel. Der direkte cholinerge Agonismus (linker Bildabschnitt) geschieht durch Interaktion von ACh an mACHRs von Harnblasenafferenzen. Ein Agonismus am M3R wirkt sich fördernd, ein Agonismus an M2R und M4R wirkt sich hemmend auf eine afferente Erregung aus. Im Gegensatz dazu führt ein Agonismus an urothelialen M2R zu einer Freisetzung verschiedener Mediatoren, wobei in dieser Darstellung (rechter Bildabschnitt) nur Bezug auf die Mediatoren ATP und NO genommen wird. ATP wirkt sich durch Interaktion mit P2X/P2Y-Purinrezeptoren fördernd, NO wirkt sich durch Interaktion mit HVACCs hemmend auf die Erregbarkeit von Harnblasenafferenzen aus.

Dieses Szenario macht deutlich, dass der direkte und der indirekte cholinerge Agonismus jeweils Mechanismen der Inhibition und Exzitation beinhalten und zudem gleichzeitig auftreten können. Auf Rezeptorebene ergeben sich daher mehrere Möglichkeiten, die sich fördernd oder hemmend auf eine afferente Erregung auswirken. Die 6 funktionellen Afferenzen könnten ein jeweils spezifisches Expressionsprofil von mACHRs, Purin- und anderen Rezeptoren aufweisen. Eine Dominanz des M3R und eine Expression von Purinrezeptoren könnte somit bei einem Teil der „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ die direkte Erregbarkeit durch Muskarin (Zagorodnyuk et al., 2009) und die Erregung durch purinerge Agonisten erklären.

Bei einer Co-Expression von M2R, M3R und M4R in einem afferenten Neuron könnten bei einem Agonismus fördernde und hemmende Effekte entweder neutralisiert, oder bei numerischer Dominanz eines bestimmten mAChR-Subtyps selektiert werden. Bei einer Co-Expression von $G_{i/o}$ -gekoppelten mAChRs und Purinrezeptoren an einem afferenten Neuron ist ebenfalls die Dominanz des jeweiligen „exzitatorischen“ und „inhibitorischen“ Rezeptors entscheidend. In dieser Konstellation könnte zunächst der direkte Agonismus an M2R oder M4R eine Inhibition hervorrufen. Durch gleichzeitigen indirekten Agonismus (siehe Abb. 8) könnte nach einiger Zeit der purinerge Einfluss überwiegen und die Exzitation fördern. Vor dem Hintergrund einer mit zunehmendem Alter steigenden, dehnungsabhängigen Freisetzung von ACh aus dem Urothel (Yoshida et al., 2006) könnten exemplarisch erläuterte Rezeptor-Expressionsprofile einer afferenten Hypersensibilität bei dem OAB-Syndrom zugrundeliegen.

4.5 Bedeutung der mAChRs an primären Afferenzen der Harnblase bei der Entstehung und Modulation afferenter Impulse

Durch die Ergebnisse in dieser Arbeit werden mAChRs an Harnblasenafferenzen als direkte Ziele für den muskarinergen Antagonismus und Agonismus etabliert. Die Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion sind bei einigen mAChR-Subtypen unterschiedlich, wodurch an sensiblen Neuronen gegenteilige Effekte entstehen können. Ein Agonismus an $G_{i/o}$ -gekoppelten M2R und M4R führt bei langsam leitenden C-Fasern der Haut zur Desensibilisierung gegen mechanische Stimulation und Hitze (Bernardini et al., 2001, 2002; Duttaroy et al., 2002). Im Gegensatz dazu bewirkt ein Agonismus durch Muskarin an $G_{q/11}$ -gekoppelten mAChR-Subtypen (vor allem am M3R) durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (siehe Kapitel 1.9) eine Sensibilisierung nozizeptiver Neurone (Haberberger et al., 2000). Guenther et al. (1999) zeigten, dass ein solcher intrazellulärer Anstieg der Kalziumkonzentration zu einer Hyperalgesie bei Stimulation mit Hitze führt. Die in unserer Studie identifizierten mAChR-Subtypen (M2R, M3R und M4R) sind daher sowohl mit Mechanismen der Sensibilisierung als auch der Desensibilisierung nozizeptiver Neurone verknüpft.

In dieser Arbeit zeigen retrograd markierte M2R-immunreaktive Neurone kleine bis mittelgroße Perikarya, was typisch für langsam leitende C-Faser-Afferenzen ist (Lawson und Waddell, 1991). Die Bestimmung der Zelldurchmesser retrograd markierter Harnblasenafferenzen zielte darauf ab, C-Faser- und A δ -Faser-Afferenzen in Bezug auf eine M2R-Expression zu unterscheiden. Der mittlere Zelldurchmesser beträgt bei M2R-positiven Neuronen 19 μm ($\pm 6 \mu\text{m}$, S.D.) und bei M2R-negativen

Neuronen $20\text{ }\mu\text{m}$ ($\pm 6\text{ }\mu\text{m}$, S.D.). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Zelldurchmesser in M2R exprimierenden und M2R nicht-exprimierenden Zellen. Dieses Ergebnis lässt zwei Schlüsse zu: Einerseits könnten nur die C-Faser-Afferenzen erfasst worden sein, wofür die kleinen und mittleren Zelldiameter sprechen. Harper und Lawson (1985) konnten bei weiblichen Ratten durch eine Kombination von intrazellulärer Registrierung peripher applizierter Reize und Farbmarkierung afferenter Neurone eine positive Korrelation zwischen neuronaler Zellgröße (Durchmesser der Soma) und axonaler Leitungsgeschwindigkeit für Neurone mit A δ - und C-Fasern herstellen. Zellkörper von A δ -Fasern zeigten eine mittlere Zellfläche von $702 \pm 448\text{ }\mu\text{m}^2$ (entspricht einem Durchmesser von $29,8 \pm 23,9\text{ }\mu\text{m}$), Zellkörper von C-Fasern zeigten eine mittlere Zellfläche von $449 \pm 148\text{ }\mu\text{m}^2$ (entspricht einem Durchmesser von $23,9 \pm 13,7\text{ }\mu\text{m}$). Diese Zahlen verdeutlichen auch, dass sich die Zellgrößen beider Neuronenklassen teilweise überlappen. Insofern ist es andererseits wahrscheinlich, dass in unserem Experiment A δ - und C-Faser-Afferenzen erfasst wurden und Neurone beider Klassen den M2R im Verhältnis gleich häufig exprimieren.

Wie in Kapitel 1.6 erörtert, konnten im Meerschweinchen letztlich 6 funktionell verschiedene Harnblasenafferenzen gefunden werden, die sich in ihrem Ansprechen auf verschiedene physikalische und chemische Stimuli unterscheiden (Zagorodnyuk et al., 2006; 2007; Xu und Gebhart, 2008). Bei 3 funktionell verschiedenen Klassen („stark antwortende Mukosa-Mechanorezeptoren“, „schwach antwortende Mukosa-Mechanorezeptoren“ und „Muskel-Mukosa-Mechanorezeptoren“) wurde hinsichtlich stimulierender Effekte nach Applikation von Muskarin auf deren rezeptive Felder untersucht. 24 % der „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ wurden direkt durch Muskarin erregt (Zagorodnyuk et al., 2009). Daraus lässt sich einerseits schließen, dass bei diesen Afferenzen eine direkte Erregung durch Aktivierung des M3R an terminalen Nervenendigungen vermittelt wird. Hinweise hierfür zeigten bereits Iijima et al. (2007), da ein M3R bevorzugender Antagonist (Darifenacin) zu einer Reduktion der dehnungsinduzierten Erregung von pelvinen A δ - und C-Faser Afferenzen bei Ratten führte. Andererseits könnte die Erregung indirekt unter Einbeziehung weiterer Signalmoleküle, freigesetzt aus dem Urothel, vermittelt werden. Im Studiendesign von Zagorodnyuk et al. (2009) wurden die potenziell hemmenden Effekte von Muskarin nicht untersucht, insofern kann hier keine Aussage hinsichtlich der Einbeziehung von M2R/M4R bei der direkten oder indirekten Signaltransduktion getroffen werden. Bei selektiver Erregung der M2R und M4R wäre eine Hemmung der Reizantwort, beispielsweise nach Stimulation durch leichten Schlag mit von Frey-Haaren, zu erwarten.

Um eine klare Korrelation zwischen der Expression von mAChR-Subtypen und den funktionellen Klassen der Harnblasenafferenzen herzustellen, wäre eine simultane Darstellung aller Parameter notwendig. Die Entwicklung subtypenspezifischer mAChR-Antikörper ist daher ein notwendiger Schritt.

5 Zusammenfassung

Vor dem klinischen Hintergrund des OAB-Syndroms trugen in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse über die Existenz eines nichtneuronalen cholinergen Systems im Urothel zunehmend zum Verständnis von Mechanismen der Detrusorüberaktivität bei. Orale muskarinrezeptorspezifische Anticholinergika werden nach aktuellen Leitlinien zur Therapie der Detrusorüberaktivität eingesetzt. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass diese Pharmaka auch bei ausbleibender parasympathischer Aktivität eine Reduktion des imperativen Harndrangs und eine verlängerte Phase der Harnspeicherung bewirken. Eine Erklärung liefert das Modell eines nichtneuronalen cholinergen Systems im Urothel, wobei ACh aus urothelialen und suburothelialen Strukturen synthetisiert und freigesetzt wird. Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme einer epithelioneuronalen Kommunikation, deren Folge unter pathologischen Bedingungen imperativer Harndrang und ein gesteigerter Miktionsreflex sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der muskarinischen Rezeptoren M1R, M2R und M3R in Afferenzen der Harnblase von Mäusen untersucht. Perikarya von Harnblasenafferenzen wurden in Kryoschnitten der Spinalganglien L6 und S1 durch ein zuvor durchgeführtes retrogrades Neurotracing identifiziert. Die Expression des M2R wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Die Expression des M1R und M3R wurde durch eine Kombination von laserassistierten Mikrodissektionen und anschließender RT-PCR analysiert. 35,2% aller Harnblasenafferenzen zeigten eine Expression des M2R. Es zeigte sich kein signifikanter Größenunterschied der Perikarya von M2R-exprimierenden und M2R-nicht-exprimierenden Zellen. In Harnblasenafferenzen wurde die Expression des M3R, jedoch nicht des M1R nachgewiesen. In Ergänzung an diese Arbeit wurde in der gemeinsam veröffentlichten Studie von Nandigama et al. (2010) die Expression des M4R, jedoch nicht des M5R gefunden. Grundsätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass die Vermittlung sensorischer Informationen aus dem Urothel und Suburothel cholinergischer Kontrolle unterliegt, wobei insbesondere die „stark antwortenden Mukosa-Mechanorezeptoren“ direkt über einen Agonismus am M3R erregt werden könnten. Auf Ebene der Signaltransduktion wird deutlich, dass die Einbeziehung des $G_{q/11}$ -gekoppelten M3R und der $G_{i/o}$ -gekoppelten M2R und M4R Mechanismen der Exzitation und der Inhibition umfasst. Inwiefern die exprimierten mAChRs den 6 funktionellen Afferenzen zuzuordnen sind und in welchem Kontext sie bei der Entstehung und Modulation von sensorischen Informationen aus dem Urothel stehen, bleibt Gegenstand aktueller Forschung. Um dies zu beantworten wäre die simultane Darstellung aller Parameter, insbesondere die Entwicklung weiterer subtypenspezifischer mAChR-Antikörper notwendig.

6 Summary

On the clinical background of the OAB-syndrome, important investigations over the last years have revealed the existence of a nonneuronal cholinergic system in the urothelium and contributed remarkably to the understanding of mechanisms in detrusor overactivity. Current guidelines for treating bladder overactivity recommend the administration of muscarinic receptor antagonists. Newer findings demonstrated that antimuscarinics cause prolonged storing and a reduction in imperative urge sensation in spite of the absence of parasympathetic activity. An explanation for this could be given by the model of a nonneuronal cholinergic system in the urothelium, including a specific synthesis and release machinery of ACh from urothelial and suburothelial cells. This lead to the hypothesis of an epithelioneuronal communication causing imperative urge sensation accompanied by increased micturition reflex in pathological conditions. In the present thesis the expression of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R by mouse bladder afferent neurons was investigated. Cell bodies of afferent neurons were identified in cryosections of DRG L6 and S1 after performing retrograde neuronal tracing using injection of fluorescent dyes into the bladder wall. The expression of M2R was studied by using immunohistochemistry, the expression of M1R and M3R was studied by using laser-assisted microdissections with subsequent RT-PCR analysis. Expression of M2R was demonstrated in 35.2% of bladder afferent neurons and revealed no significant difference in cell size of M2R-expressing- and M2R-non-expressing afferent neurons. Further, the expression of M3R but not M1R in bladder afferent neurons was demonstrated. In addition to the present paper, expression of M4R but not M5R was shown in the common published study of Nandigama et al. (2010). Generally, these results constrain the cholinergic control in processing sensory information from urothelium and suburothelium. In particular the “high responding mucosa mechanoreceptors” could be excited directly by activating M3R. Regarding signal transduction, both excitatory and inhibitory mechanisms are potentially involved by the inclusion of the $G_{q/11}$ -coupled M3R and the $G_{i/o}$ -coupled M2R and M4R in mAChR expression profile of bladder afferent neurons. The precise correlation of mAChR subtype expression within the 6 functional subpopulations and their involvement in processing and modulating sensory information from the urothelium engages actual research and would be elucidated by a simultaneous demonstration of all parameters. A prerequisite will be the development of subtype specific mAChR antibodies.

7 Abkürzungsverzeichnis

Acetylcholin	ACh
Adenosintriphosphat	ATP
Atropin-Methylnitrat	AMN
Aminomethylcoumarin-Acetat	AMCA
Basenpaare	bp
Carnitinacetyltransferase	CarAT
Cholinacetyltransferase	ChAT
Deoxyribonukleinsäure	DNA
Fast Blue	FB
Fluorescein-Isothiocyanat	FITC
Ganglion cervicale superius	GCS
Hoch-spannungsaktivierten Kalziumkanäle	HVACCs
Indocarbocyanin	Cy3
Inositol-1,4,5-triphosphat	IP ₃
International Continence Society	ICS
Laser pressure catapulting	LPC
Messenger-RNA	mRNA
Muscarinic Toxin 3	MT-3
Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren	mAChRs
Muskarinrezeptor Subtyp 1-5	M1R-M5R
N ω -nitro-L-arginin Methylester hydrochlorid	L-NAME
organische Kationentransporter	OCT
Overactive Bladder	OAB
Oxotremorin-Methiodid	OxoM
Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat	PIP ₂
Polymerase Kettenreaktion	PCR
Reverse Transkriptase	RT
Reverse Transkription mit nachfolgender PCR	RT-PCR
Ribonukleinsäure	RNA
Spannungsaktivierte Kalziumkanäle	VACCs
Spinalganglion	DRG
Beta-2-Mikroglobulin	BMG
Standardabweichung	S.D.
Transient Receptor Potential channels	TRP

Transmembranäre Domäne 1-7	TM1-TM7
Vanilloid-Receptor 1	VR1
vesikulärer Acetylcholintransporter	VACht
Complementäre DNA	cDNA
Zyklisches Adenosinmonophosphat	cAMP
1,1',Di-Octadecyl-3,3,3'-	
Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat	DiI
2',3'-O-trinitrophenyl-ATP	TNP-ATP
3-Quinuclidinyl Benzilat	QNB
4-[[4-formyl-5-hydroxy-6-methyl-3- [(phosphonoxy)methyl]-2-pyridinyl] azo]- 1,3-benzenedisulfonic acid tetrasodium salt]	PPADS

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Schematischer Wandaufbau der Harnblase bei Säugetieren, von luminal nach basal.

Abb. 2 Laserassistierte Mikrodissektionen von retrograd markierten Harnblasenafferenzen des DRG L6, aufgenommen unter dem 20x Objektiv.

Abb. 3 Anschnitt der Trachea unter Durchlicht während und nach den Mikrodissektionen.

Abb. 4 RT-PCR. Das Agarosegel zeigt amplifizierte DNA der Positivkontrollen von Mikrodissektionen aus dem GCS.

Abb. 5 RT-PCR. Das Agarose-Gel zeigt amplifizierte DNA aus Trachealepithelzellen.

Abb. 6 RT-PCR. Agarose-Gel von amplifizierter DNA aus Trachealepithelzellen, GCS, Dil-markierten und nicht-markierten Nervenzellen aus dem Ganglion S1 sowie die Negativkontrollen ohne RT für Öl und den PCR-Mastermix.

Abb. 7 Ausschnitt eines Gefrierschnittes des DRG L6 von der Maus nach retrograder Markierung afferenter Neurone (Kapitel 2.1.2), fotografiert unter dem 20x Objektiv bei UV-Anregung.

Abb. 8 Darstellung der Häufigkeit FB-positiver Zellen, mit und ohne den M2R, geordnet nach Zellgröße in 5 µm-Intervallen.

Abb. 9 Darstellung purinerger und cholinерger Signalwege bei der Modulation der Erregung von Harnblasenafferenzen in einem integrativen Modell im schematischen Wandaufbau der Harnblase von Säugetieren (Vergleiche Abb. 1).

Tabelle 1. Auflistung der verwendeten Reagenzien und Mengen bei der Durchführung einer reversen Transkription.

Tabelle 2. Auflistung der verwendeten Primerpaare unter Angabe der Accession №, DNA-Sequenz, Produktgröße und Position der amplifizierten DNA-Fragmente im jeweiligen Gen.

Tabelle 3. Auflistung der Reagenzien und Mengen bei der Durchführung einer PCR.

Tabelle 4. Auflistung der Bestandteile, deren Hersteller und Konzentrationen eines 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarose Gels.

Tabelle 5. Auflistung der Bestandteile, Hersteller und Mengen des verwendeten Ladepuffers.

Tabelle 6. Zuordnung der Erreger- und Sperrfilter zum jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff unter Angabe des Filternamens, Farbe und Wellenlängen in Nanometer.

9 Literaturverzeichnis

Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, De Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 148: 565-78

Abrams P, Andersson KE (2007) Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder. *BJU Int* 100: 987-1006

Andersson KE, Arner A (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 84: 935-986

Andersson KE, Wein AJ (2004) Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* 56: 581-631

Andersson KE, Chapple CR, Cardozo L, Cruz F, Hashim H, Michel MC, Tannenbaum C, Wein AJ (2009) Pharmacological treatment of overactive bladder: report from the International Consultation on Incontinence. *Curr Opin Urol* 19: 380-394

Applebaum AE, Vance W H et al. (1980) Segmental localization of sensory cells that innervate the bladder. *J Comp Neurol* 192: 203-209

Armstrong CM, Hille B (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20: 371-80

Beckel JM, Kanai A, Lee SJ, De Groat WC, Birder LA (2006) Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F103-10

Bernardini N, Sauer SK, Haberberger R, Fischer MJ, Reeh PW (2001) Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin. *J Neurosci* 21: 3295-302

Bernardini N, Roza C, Sauer SK, Gomeza J, Wess J, Reeh PW (2002) Muscarinic M2 receptors on peripheral nerve endings: a molecular target of antinociception. *J Neurosci* 22: RC229

Birder LA, Kanai AJ, De Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ (2001) Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13396-13401

Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ (2002a) Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 5: 856-60

Birder LA, Nealen ML, Kiss S, De Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G, Kanai AJ (2002b) Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 22: 8063-70

Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA, Roppolo JR, Ford AP, De Groat WC, Burnstock G (2004) Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F1084-91

Birder LA (2005) More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: 489-495

Birder LA, De Groat WC (2007) Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 4: 46-54

Blin N, Yun J, Wess J (1995) Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 270: 17741-17748

Blok BF, Willemsen T, Holstege G (1997) A PET Study of Brain control of micturition in humans. *Brain* 1997; 120:111-121 (zitiert nach Fowler CJ, Griffiths D et al., 2008)

Blok BF, Holstege G (1999) Two pontine micturition centers in the cat are not interconnected directly: implications for the central organization of micturition *J Comp Neurol* 403: 209-18

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237: 527-532

Bonner TI, Young AC, et al. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1: 403-410

Brazzelli M, Murray A, Fraser C (2006) Efficacy and safety of sacral nerve stimulation for urinary urge incontinence: a systematic review. *J Urol* 175: 835-41

Brederson JD, Jarvis MF (2008) Homomeric and heteromeric P2X3 receptors in peripheral sensory neurons. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 716-25

Brierley, SM, Jones RC 3rd, Gebhart GF, Blackshaw LA (2004) Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. *Gastroenterology* 127: 166-178

Bschleipfer TK, Schukowski, Weidner W, Grando SA, Schwantes U, Kummer W, Lips KS (2007) Expression and distribution of cholinergic receptors in the human urothelium. *Life Sci* 80: 2303-2307

Burnstock G (2001) Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 22: 182-188

Cao XH, Byun HS, Chen SR, Pan HL (2011) Diabetic neuropathy enhances voltage-activated Ca²⁺ channel activity and its control by M4 muscarinic receptors in primary sensory neurons. *J Neurochem* 119: 594-603

Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* 46: 413-418

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58: 319-379

Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279-290

Chen SR, Pan HL (2003) Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 676-681

Chess-Williams R, Chapple CR, Yamanishi T, Yasuda K, Sellers DJ (2001) The minor population of M3-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. *J Auton Pharmacol* 21: 243-8

Chess-Williams R (2002) Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol* 22: 133-45

Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel JM, Zeidel ML, Ford AP, De Groat WC, Birder LA (2005) Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* 562: 859-71

Copois V, Bibeau F, Bascoul-Mollevi C, Salvétat N, Chalbos P, Bareil C, Candeil L, Fraslon C, Conseiller E, Granci V, Maziere P, Kramar A, Ychou M, Pau B, Martineau P, Molina F, Del Rio M (2007) Impact of RNA degradation on gene expression profiles: assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *J Biotechnol* 127: 549-559

Curtis CA, Wheatley M, Bansal S, Birdsall NJ, Eveleigh P, Pedder EK, Poyner D, Hulme EC (1989) Propylbenzylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J Biol Chem* 264: 489-495

Dang K, Bielefeldt K, Gebhart GF (2005) Differential responses of bladder lumbosacral and thoracolumbar dorsal root ganglion neurons to purinergic agonists, protons, and capsaicin. *J Neurosci* 25: 3973-84

De Groat WC, Booth AM, Milne RJ, Roppolo JR (1982) Parasympathetic preganglionic neurons in the sacral spinal cord. *J Auton Nerv Syst* 5: 23-43

De Groat WC, Booth AM, Yoshimura N (1993) Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease, in *The Autonomic Nervous System, Chapter 8: Nervous Control of the Urogenital System* (Maggi CA ed) vol 6, pp 227–289, Harwood Academic Publishers, London, UK (zitiert nach Andersson und Wein, 2004).

De Groat WC (1997) A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 50: Suppl. 36-52; discussion 53-56 (zitiert nach Zagorodnyuk et al., 2006)

De Groat WC et al. (1999) Basic neurophysiology and neuropharmacology, in *Incontinence, 1st International Consultation on Incontinence* (Abrams P et al. eds) pp 105–154, Plymbridge Distributors Ltd., Plymouth, UK. (zitiert nach Andersson und Wein, 2004)

De Groat WC, Yoshimura N (2011) Plasticity in reflex pathways to the lower urinary tract following spinal cord injury. *Exp Neurol* 235: 123-32

De Laet K, De Wachter S, Wyndaele JJ (2006) Systemic oxybutynin decreases afferent activity of the pelvic nerve of the rat: new insights into the working mechanism of antimuscarinics. *Neurourol Urodyn* 25: 156-61

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (Stand 06/2010, gültig bis 06/15) Die überaktive Blase (ÜAB). Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. AWMF-Register Nr. 015/007 Klasse: S2k

Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J (2002) Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 62: 1084-1093

Ellis J, Seidenberg M, Brann M (1993) Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol* 44: 583-588

Ernstrom GG, Chalfie M (2002) Genetics of sensory mechanotransduction. *Annu Rev Genet* 36: 411-453

Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J* 9: 619-25

Fink L, Seeger W, Ermer L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4: 1329-33

Fink L, Kinfe T, Seeger W, Ermert L, Kummer W, Bohle RM (2000) Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation. *Am J Pathol* 157: 1459-66

Fink L, Bohle RM (2005) Laser microdissection and RNA analysis. *Methods Mol Biol* 293: 167-85

Finney SM, Andersson KE, Gillespie JI, Stewart LH (2006) Antimuscarinic drugs in detrusor overactivity and the overactive bladder syndrome: motor or sensory actions? *BJU Int* 98: 503-507

Fowler CJ, Griffiths D, De Groat WC (2008) The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci* 9: 453-466

Gabella G, Davis C (1998) Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol* 27: 141-155

Gao ZG, Jacobson KA (2013) Allosteric modulation and functional selectivity of G protein-coupled receptors. *Drug Discov Today Technol* 10: 237-243

Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, Owsianik G, Liedtke W, Daelemans D, Dewachter I, Van Leuven F, Voets T, De Ridder D, Nilius B (2007) Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest* 117: 3453-62

Giglio D, Delbro DS, Tobin G (2005) Postjunctional modulation by muscarinic M2 receptors of responses to electrical field stimulation of rat detrusor muscle preparations. *Auton Autacoid Pharmacol* 25: 113-20

Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR (1999) Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog* 25: 86-91

Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol* 5: 157-67

Griffiths D, Holstege G, Dalm X, De Wall H (1990) Control and coordination of bladder and urethral function in the brainstem of the cat. *Neurourol Urodyn* 9: 63-82 (zitiert nach Abrams P, Andersson KE 2007)

Griffiths D, Tadic SD (2008) Bladder control, urgency, and urge incontinence: evidence from functional brain imaging. *Neurourol Urodyn* 27: 466-474

Guenther S, Reeh PW, Kress M (1999) Rises in $[Ca^{2+}]_i$ mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *Eur J Neurosci* 11: 3143-50

Haberberger R, Scholz R, Kummer W, Kress M (2000) M2-receptor subtype does not mediate muscarine-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ in nociceptive neurons of rat dorsal root ganglia. *J Neurophysiol* 84: 1934-41

Häbler HJ, Janig W, Koltzenburg M (1990) Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 425: 545-562

Häbler HJ, Janig W, Koltzenburg M (1993) Myelinated primary afferents of the sacral spinal cord responding to slow filling and distension of the cat urinary bladder. *J Physiol* 463: 449-60

Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482: 547-51

Hall JM, Caulfield MP, Watson SP, Guard S (1993) Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 14: 376-83

Hamill OP, Martinac B (2001) Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 81: 685-740

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13311-6

Hannan F, Hall LM (1993) Muscarinic acetylcholine receptors in invertebrates: comparisons with homologous receptors from vertebrates. *Exs* 63: 98-145

Harper AA, Lawson SN (1985) Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359: 31-46

Hayashida KI, Bynum T, Vincler M, Eisenach JC (2006) Inhibitory M2 muscarinic receptors are upregulated in both axotomized and intact small diameter dorsal root ganglion cells after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 140: 259-268

Hegde SS, Choppin A, Bonhaus D, Briaud S, Loeb M, Moy TM, Loury D, Eglen RM (1997) Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 120: 1409-18

Hegde SS, Eglen RM (1999). Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci* 64: 419-28.

Hou X, Wehrle J, Menge W, Ciccarelli E, Wess J, Mutschler E, Lambrecht G, Timmerman H, Waelbroeck M (1996) Influence of monovalent cations on the binding of a charged and an uncharged ('carbo-') muscarinic antagonist to muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 117: 955-961

Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 633-673

Iggo A (1955) Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. *J Physiol* 128: 593-607

Iijima K, De Wachter S, Wyndaele JJ (2007) Effects of the M3 receptor selective muscarinic antagonist darifenacin on bladder afferent activity of the rat pelvic nerve. *Eur Urol* 52: 842-847

Irwin DE, Milsom I, Hunskaar S, Reilly K, Kopp Z, Herschorn S, Coyne K, Kelleher C, Hampel C, Artibani W, Abrams P (2006) Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study. *Eur Urol* 50: 1306-14; discussion 1314-5

Janig W, Morrison JF (1986) Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res* 67: 87-114 (zitiert nach Andersson und Wein, 2004)

Jolkkonen M, van Giersbergen PL, Hellman U, Wernstedt C, Karlsson E (1994) A toxin from the green mamba *Dendroaspis angusticeps*: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors. *FEBS Lett* 352: 91-4

Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W (2009) Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379: 389-95

Kim JC, Yoo JS, Park EY, Hong SH, Seo SI, Hwang TK (2008) Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. *BJU Int* 101: 371-5

Kim Y, Yoshimura N, Masuda H, De Miguel F, Chancellor MB (2005) Antimuscarinic agents exhibit local inhibitory effects on muscarinic receptors in bladder-afferent pathways. *Urology* 65: 238-242

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 515-523

Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P (2009) Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33: 1113-21

Kostenis E, Botero Cid HM, Holzgrabe Y, Mohr K (1996) Evidence for a multiple binding mode of bispyridinium-type allosteric modulators of muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 314: 385-392

Krejci A, Michal P, Jakubik J, Ricny J, Dolezal V (2004) Regulation of signal transduction at M2 muscarinic receptor. *Physiol Res* 53: 131-140

Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK (2012) Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482: 552-6

Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hubner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J, Kobilka BK (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504: 101-6

Kruse AC, Hu J, Kobilka BK, Wess J (2014) Muscarinic acetylcholine receptor X-ray structures: potential implications for drug development. *Curr Opin Pharmacol* 16: 24-30

Kullmann FA, Artim DE, Birder LA, De Groat WC (2008a) Activation of muscarinic receptors in rat bladder sensory pathways alters reflex bladder activity. *J Neurosci* 28: 1977-1987

Kullmann FA, Artim D, Beckel J, Barrick S, De Groat WC, Birder LA (2008b) Heterogeneity of muscarinic receptor-mediated Ca²⁺ responses in cultured urothelial cells from rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: 971-981

Kummer W (2007) Molekulare Anatomie des cholinergen Systems der Harnblase. Deutsche Kontinenzgesellschaft (Hrsg) Bamberger Gespräche 2007. Pharmakotherapie und Harninkontinenz im Spannungsfeld von Praxis und Forschung. Satz und Druck Römerdruck Bamberg

Kurtenbach E, Curtis CA, Pedder EK, Aitken A, Harris AC, Hulme EC (1990) Muscarinic acetylcholine receptors. Peptide sequencing identifies residues involved in antagonist binding and disulfide bond formation. *J Biol Chem* 265: 13702-13708

Lawson SN, Waddell PJ (1991) Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol* 435: 41-63.

Lazareno S, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A, Birdsall NJ (1998) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol Pharmacol* 53: 573-89

Lewis SA (2000) Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F867-74

Lincoln J, Burnstock G (1993) Autonomic innervation of the urinary bladder and urethra, in *The Autonomic Nervous System, Chapter 2, Nervous Control of the Urogenital System* (Maggi CA ed) vol 6, pp 33-68, Harwood Academic Publisher, London, UK (zitiert nach Andersson und Wein, 2004)

Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, Kummer W (2007) Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51: 1042-1053

Liu J, Conklin BR, Blin N, Yun J, Wess J (1995) Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11642-11646

Lu ZL, Curtis CA, Jones PG, Pavia J, Hulme EC (1997) The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and

tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling. *Mol Pharmacol* 51: 234-241

Matsumoto Y, Miyazato M, Furuta A, Torimoto K, Hirao Y, Chancellor MB, Yoshimura N (2010) Differential roles of M2 and M3 muscarinic receptor subtypes in modulation of bladder afferent activity in rats. *Urology* 75: 862-867

Miller JH, Aagaard PJ, Gibson VA, McKinney M (1992) Binding and functional selectivity of himbacine for cloned and neuronal muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 663-667

Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ (2001) How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int* 87: 760-766

Morgan C, Nadelhaft I, De Groat WC (1981) The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus. *J Comp Neurol* 201: 415-40

Morrison J (1999) The activation of bladder wall afferent nerves. *Exp Physiol* 84: 131-136

Murray E, Malley SE, Qiao LY, Hu VY, Vizzard MA (2004) Cyclophosphamide induced cystitis alters neurotrophin and receptor tyrosine kinase expression in pelvic ganglia and bladder. *J Urol* 172: 2434-9

Nandigama R, Bonitz M, Papadakis T, Schwantes U, Bschleipfer T, Kummer W (2010) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed by mouse bladder afferent neurons. *Neuroscience* 168: 842-850

Nardos R, Gregory WT, Krisky C, Newell A, Nardos B, Schlaggar B, Fair DA (2014) Examining mechanisms of brain control of bladder function with resting state functional connectivity MRI. *Neurourol Urodyn* 33: 493-501

Onufrowicz B (1899) Notes on the arrangement and function of the cell groups in the sacral region of the spinal cord. *J Nerv Ment Dis* 26: 498–504

Page AJ, Blackshaw LA (1998) An in vitro study of the properties of vagal afferent fibres innervating the ferret oesophagus and stomach. *J Physiol* 512: 907-916

Pals-Rylaarsdam R, Hosey MM (1997) Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 272: 14152-14158

Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *Embo J* 6: 3923-3929

Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117-161

Pradidarcheep W, Labruyere WT, Dabhoiwala NF, Lamers WH (2008) Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J Histochem Cytochem* 56: 1099-111

- Reeves P, Irwin D, Kelleher C, Milsom I, Kopp Z, Calvert N, Lloyd A (2006) The current and future burden and cost of overactive bladder in five European countries. *Eur Urol* 50: 1050-1057
- Schrage R, Holze J, Klockner J, Balkow A, Klause AS, Schmitz AL, De Amici M, Kostenis E, Trankle C, Holzgrabe U, Mohr K (2014) New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist [(3)H]iperoxo. *Biochem Pharmacol* 90: 307-19
- Sellers DJ, Chess-Williams R (2012) Muscarinic agonists and antagonists: effects on the urinary bladder. *Handb Exp Pharmacol*(208): 375-400
- Sengupta JN, Gebhart GF (1994) Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. *J Neurophysiol* 72: 2420-2430
- Shea VK, Cai R, Crepps B, Mason JL, Perl ER (2000) Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the Rat's urinary bladder. *J Neurophysiol* 84: 1924-1933
- Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA, Hulme EC (1994) Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 269: 4092-4097
- Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, Hunt TL, Wein AJ (2003) Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* 20: 327-336
- Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC (1983) Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol* 23: 551-557
- Su X, Sengupta JN, Gebhart GF (1997) Effects of opioids on mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. *J Neurophysiol* 77: 1566-80
- Tata AM, Tripiciano A, Filippini A, Biagioni S, Augusti-Tocco G (2000) Muscarinic receptors modulate intracellular calcium level in chick sensory neurons. *Brain Res* 866: 65-72
- Vanhoutte PM, Humphrey PPA, Spedding M (1998) NC-IUPHAR receptor nomenclature criteria. *Pharmacol Rev*, in press. (zitiert nach Caulfield und Birdsall, 1998)
- van Koppen CJ, Nathanson NM (1990) Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem* 265: 20887-20892
- Vizzard MA, Erickson VL, Card JP, Roppolo JR, De Groat WC (1995) Transneuronal labeling of neurons in the adult rat brainstem and spinal cord after injection of pseudorabies virus into the urethra. *J Comp Neurol* 355: 629-640
- Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Trankle C, Buller S, Ellis J, Holtje HD, Mohr K (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* 64: 21-31

- Wang EC, Lee JM, Johnson JP, Kleyman TR, Bridges R, Apodaca G (2003) Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F651-63
- Wang H, Owens JD, Shih JH, Li MC, Bonner RF, Mushinski JF (2006) Histological staining methods preparatory to laser capture microdissection significantly affect the integrity of the cellular RNA. *BMC Genomics* 7: 97
- Wang HF, Shortland P, Park MJ, Grant G (1998) Retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase-conjugated cholera toxin B subunit, wheatgerm agglutinin and isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in primary afferent neurons innervating the rat urinary bladder. *Neuroscience* 87: 275-288
- Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR (1995) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 959-66
- Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 14: 308-313
- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10: 69-99
- Wess J, Liu J, Blin N, Yun J, Lerche C, Kostenis E (1997) Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sci* 60: 1007-1014
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205
- Xu L, Gebhart GF (2008) Characterization of mouse lumbar splanchnic and pelvic nerve urinary bladder mechanosensory afferents. *J Neurophysiol* 99: 244-253
- Yoshida M, Miyamae K, Iwashita H, Otani M, Inadome A (2004) Management of detrusor dysfunction in the elderly: changes in acetylcholine and adenosine triphosphate release during aging. *Urology* 63: 17-23
- Yoshida M, Inadome A, Maeda Y, Satoji Y, Masunaga K, Sugiyama Y, Murakami S (2006) Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. *Urology* 67: 425-30
- Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Yono M, Homma Y (2010) The forefront for novel therapeutic agents based on the pathophysiology of lower urinary tract dysfunction: pathophysiology and pharmacotherapy of overactive bladder. *J Pharmacol Sci* 112: 128-134
- Yoshimura N, Seki S, De Groat WC (2001) Nitric oxide modulates Ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder. *J Neurophysiol* 86: 304-11
- Yu Y, de Groat WC (2010) Effects of stimulation of muscarinic receptors on bladder afferent nerves in the in vitro bladder-pelvic afferent nerve preparation of the rat. *Brain Res* 1361: 43-53
- Zagorodnyuk VP, Costa M, Brookes SJ (2006) Major classes of sensory neurons to the urinary bladder. *Auton Neurosci* 126-127: 390-397

Zagorodnyuk VP, Gibbins IL, Costa M, Brookes SJ, Gregory SJ (2007) Properties of the major classes of mechanoreceptors in the guinea pig bladder. *J Physiol* 585: 147-163

Zagorodnyuk VP, Brookes SJ, Spencer NJ, Gregory S (2009) Mechanotransduction and chemosensitivity of two major classes of bladder afferents with endings in the vicinity to the urothelium. *J Physiol* 587: 3523-3538

Zarghooni S, Wunsch J, Bodenbenner M, Bruggmann D, Grando SA, Schwantes U, Wess J, Kummer W, Lips KS (2007) Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci* 80: 2308-2313

Zhu SZ, Wang SZ, Hu J, el-Fakahany EE (1994) An arginine residue conserved in most G protein-coupled receptors is essential for the function of the m1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 45: 517-523

10 Publikation

10.1 Originalarbeit

Nandigama R, **Bonitz M**, Papadakis T, Schwantes U, Bschleipfer T, Kummer W (2010) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed by mouse bladder afferent neurons. Neuroscience 168: 842-50

10.2 Abstracts

Nandigama R, **Bonitz M**, Papadakis T, Schwantes U, Frahn S, Ibanez-Tallon I, Lips KS, Kummer W (2008) Bladder afferent neurons express nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in the mouse. J Urol 179: 130-131

Nandigama R, **Bonitz M**, Papadakis T, Möller S, Illig C, Schwantes U, Bschleipfer T, Kummer W (2009) Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in mouse bladder afferent neurons and their expression profile in lumbosacral afferents in bladder outlet obstruction. Auton Neurosci 149: 85-86

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten, sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Göttingen, 16.06.2015

Marcus Bonitz

12 Danksagung

Für die Überlassung dieses interessanten und wichtigen Themas meiner Arbeit und die vom Institut gewährten Mittel möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Kummer bedanken. Er ermöglichte mir die rasche Integration in das Forscherteam der Anatomie, stand mir mit praktischem Rat, seinem großen wissenschaftlichen Fundus und konstruktiver Kritik während der Durchführung der Experimente, Literaturrecherche und Anfertigung der Dissertationsschrift zur Seite. Ihm verdanke ich die Einarbeitung bei der Durchführung des retrograden Tracings der Harnblase von Mäusen und Gewebeentnahme, verknüpft mit anatomischer Lehre. Nicht zuletzt seine unkomplizierte, humorvolle, angenehme und stets respektvolle Art prägte den persönlichen Umgang des gesamten Forscherteams. Bei Frau Dr. Gabriela Krasteva-Christ möchte ich mich für die Betreuung im Labor bedanken. Selbständigkeit bei der Durchführung der laserassistierten Mikrodissektionen und den nachfolgenden Genanalysen verdanke ich ihrer Einarbeitung. Ohne Ihren Rat und die Unterstützung bei der Fehleranalyse wäre die Etablierung und Anwendung der komplexen Methodik ohne Erfolg geblieben. Frau Silke Wiegand danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und Umgang mit sämtlichen labortechnischen Anlagen. Sie stand mir während der gesamten Laborarbeit bei allen auftretenden Problemen geduldig mit Ihrer Erfahrung und Rat zur Verfügung. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Tamara Papadakis. Ihrer Unterstützung im Labor verdanke ich das Erlernen der immunhistochemischen Technik und die selbständige Fluoreszenzmikroskopie. Ein Großteil der für diese Arbeit relevanten immunhistochemischen Markierungen und Bildermontagen wurde von ihr in unzähligen Arbeitsstunden durchgeführt. Ich danke Herrn Martin Bodenbender für die Unterstützung und seinen Rat bei allen Fragen und Problemen, die die Durchführung der Tierexperimente betrafen. Mein Dank gilt Herrn Dr. Rajender Nandigama, mit dem ich wertvolle Erfahrungen bei der Durchführung der Mikrodissektionen austauschen konnte. Ganz besonders danke ich ihm für die mühevollen Arbeit, die er für die wissenschaftliche Präsentation meiner Ergebnisse in der gemeinsamen Studie aufbrachte. Frau Karola Michael danke ich für die graphische Gestaltung der Publikation.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin für das Interesse und die liebevolle Unterstützung in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit.